



HAL
open science

Rôle de la dysfonction mitochondriale dans deux maladies neurodégénératives, la Maladie de Huntington et la Maladie de Parkinson

Maria Damiano

► **To cite this version:**

Maria Damiano. Rôle de la dysfonction mitochondriale dans deux maladies neurodégénératives, la Maladie de Huntington et la Maladie de Parkinson. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066584 . tel-01140700

HAL Id: tel-01140700

<https://theses.hal.science/tel-01140700>

Submitted on 9 Apr 2015

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 3C – Cerveau Cognition Comportement

**Rôle de la dysfonction mitochondriale dans deux
maladies neurodégénératives, la Maladie de Huntington
et la Maladie de Parkinson**

La mitochondrie et la neurodégénérescence

Par **Maria DAMIANO**

Thèse de doctorat de **Neurosciences**

Dirigée par le Dr Olga CORTI

Présentée et soutenue publiquement le 6 Mai 2014

Devant un Jury composé par :

Dr Fatiha NOTHIAS, Directeur de Recherche, Président du Jury
Dr Agnès RÖTIG, Directeur de Recherche, Rapporteur
Dr Carine CLEREN, Maître de conférences, Rapporteur
Dr Mario GOMES-PEREIRA, Chargé de Recherche Examineur
Dr Emmanuel BROUILLET, Directeur de Recherche, Examineur

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Prof. Giovanni Manfredi, pour avoir ouvert mon esprit dans le domaine de la mitochondrie et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, lieu de départ de cette odyssée dans l'univers des Neurosciences ; mes remerciements sont aussi dédiés à Marilena D'Aurelio, de l'équipe de Giovanni. Leur conseil, se prolongeant au delà des années au cours desquelles nous avons formellement travaillé ensemble, m'ont permis d'achever ce qui représente pour moi l'organisation logique d'un bagage théorique et technique acquis pendant mon voyage dans cet univers d'inépuisable richesse.

Je voudrais remercier le Prof. Flint M Beal, dont l'admirable maîtrise du « Savoir » en matière de Neurologie et de Neurodégénérescence a déterminé le positionnement approfondi de mes standards de connaissance.

Mes remerciements chaleureux vont aussi aux Drs Olga Corti et Emmanuel Brouillet, ainsi qu'à leurs équipes. Tout d'abord pour leur aide et soutien à la paillasse, indispensable lorsque j'ai dû acquérir des nouvelles compétences techniques. Ils méritent mes remerciements aussi pour la patience avec laquelle ils m'ont suivie lorsque je me suis confrontée avec la sphère scientifique française (l'orthographe et la grammaire). La valeur de leur présence pendant cette expérience dépasse les difficultés techniques rencontrées dans ce parcours et se concrétise dans ce manuscrit et dans nos travaux scientifiques.

Mes remerciements au Dr Anne Lombes, dont j'admire à la fois l'énergie de jeune chercheuse à la paillasse et l'autorité intellectuelle.

Je remercie Mme Uebersfeld, pour son aide pendant les différentes phases de cette démarche de VAE, ainsi que les membres de la première commission d'évaluation de mon dossier et de ce Jury qui par leur disponibilité m'offrent la possibilité de finaliser mon parcours de formation.

Je dois remercier infiniment Mme Annette Del Negro et M Mamhoud Ouerghi. Leur contribution a été substantielle et m'a permis d'achever une maîtrise acceptable de la langue française.

Des remerciements chaleureux sont dédiés à mes amis, Mario, Eleonora, Marta, Peggy *et al.*, dont la présence a nuancé les tonalités variables du gris de mon humeur tout au long de la préparation de ce manuscrit.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux sont dédiés à ma famille, à mes parents, mes nièces et mon neveu surtout. En dépit de leurs collocations géographiques et de leurs âges, avancés ou précoces, les premiers m'ont fourni l'équilibre et la rationalité, les derniers l'énergie et la vivacité, par leur intangible présence.

TABLE DES MATIERES

Les sous-sections essentielles sont listées ici; leur numérotation ne correspond pas forcément à celle adoptée dans les tables des matières comprises dans les sections individuelles

| | |
|--|--------|
| Table des matières | p. 1 |
| Liste des abréviations récurrentes | p. 3 |
| Introduction a mes projets sur deux maladies neurodégénératives : la Maladie de Huntington, MH, et la Maladie de Parkinson, MP | p. 5 |
| Chapitre 1. Introduction | p. 9 |
| I. Clinique et génétique des deux maladies | p. 10 |
| II. Le système des ganglions de la base ; altérations neuropathologiques au cours des MH et MP | p. 39 |
| III. Mécanismes pathogéniques communs aux maladies neurodégénératives | p. 54 |
| III.1 Stress oxydant | p. 56 |
| III.2 Hyperactivation des systèmes de neurotransmission | p. 61 |
| III.3 Neuroinflammation | p. 70 |
| IV. Mécanismes pathogéniques au cours de la MH | p. 73 |
| IV.1 Rôle physiologique de la HTT et conséquences de la présence de l'expansion du domaine polyQ. | p. 80 |
| IV.1.1 Rôle dans la transcription | p. 80 |
| IV.1.2 Rôle dans la dynamique des vésicules et le transport axonal ; interaction avec les protéines HIP et HAP | p. 85 |
| IV.1.3 Rôle dans l'embryogenèse et la neurogénèse | p. 90 |
| IV.1.4 Rôle anti-apoptotique et pro-survie | p. 91 |
| IV.2 La HTT mutée. Propriétés et mécanismes pathogéniques additionnels | p. 94 |
| IV.2.1 Le clivage de la HTT mutée | p. 94 |
| IV.2.2 Formation des agrégats | p. 96 |
| IV.2.3 Dérégulation du Système Ubiquitine-Protéasome au cours de la MH | p. 98 |
| IV.2.4 La HTT mutée et l'autophagie | p. 99 |
| IV.2.5 La dysfonction mitochondriale au cours de la MH | p.103 |
| V. Mécanismes pathogéniques au cours de la MP | p.104 |
| V.1 Protéinopathies, l' α -synucléine et la formation des agrégats | p.112 |
| V.2 Dysfonction des systèmes de contrôle de qualité | p.116 |
| V.3 Dysfonction mitochondriale au cours de la MP | p.128 |
| V.4 Dysfonctions synaptiques au cours de la MP | p.131 |
| V.5 Participation des protéines impliquées dans la MPF aux majeures voies de signalisation intracellulaire | p. 135 |

| | |
|---|--------|
| Chapitre 2. Dysfonction mitochondriale dans la MH et la MP | p. 139 |
| VI. La fonction mitochondriale et son implication dans la MH et la MP | p. 141 |
| VI.1 La respiration mitochondriale | p. 144 |
| VI.2 Le cycle de Krebs | p. 147 |
| VI.3 La production mitochondriale des EROs | p. 149 |
| VI.4 La capacité mitochondriale de stockage de Ca ²⁺ : contribution mitochondriale à l'excitotoxicité | p. 156 |
| VI.5 Contribution mitochondriale à la neuroinflammation | p. 158 |
| VI.6 Régulation nucléaire de la fonction mitochondriale | p. 159 |
| VI.7 La fusion et la fission mitochondriale | p. 163 |
| VI.8 La voie de signalisation Nrf2/Keap 1 | p. 170 |
| VI.9 La voie PINK1/Parkine et la mitophagie | p. 171 |
| VII. Projet I : Dysfonction mitochondriale dans des modèles rongeurs de MH | p. 177 |
| VII.1 Contexte : anomalies de la phosphorylation oxydative au cours de la MH | p. 178 |
| VII.2 Objectifs | p. 181 |
| VII.3 Principales méthodologies utilisées | p. 191 |
| VII.4 Résultats | p. 208 |
| VII.5 Discussion et perspectives | p. 214 |
| VII.6 Données supplémentaires et remarques de conclusion | p. 218 |
| VII.7 Article 1 | |
| VIII. Projet II : Caractérisation des interactions fonctionnelles entre les protéines Parkine et PINK1, associées aux formes récessives de la MP, et la protéine Drp1, principal acteur de la machinerie de fission mitochondriale | p. 223 |
| VIII.1 Contexte : Parkine et PINK1 jouent un rôle dans le contrôle de la morphologie mitochondriale | p. 224 |
| VIII.2 Objectifs | p. 226 |
| VIII.2 Méthodologie | p. 227 |
| VIII.4 Résultats | p. 235 |
| VIII.5 Discussion et perspectives | p. 243 |
| VIII.6 Article 2 | |
| IX. Annexes | p. 247 |
| Article 3 | |
| Article 4 | |
| X. Remarques de conclusion | p. 262 |
| Table des illustrations | p. 267 |
| Table des tableaux | p. 270 |
| XI. Bibliographie | p. 271 |

Liste des abréviations récurrentes

3NP acide 3 nitropropionique

AAV Adeno associated virus

Akt serine/threonine kinase

AMPc Adenosine monophosphate cyclic

ADN Acide désoxyribonucléique

ARN Acide ribonucléique

ATP Adenosine-triphosphate

BAC Bacterial artificial chromosome

BDNF Brain derived neurotrophic factor

CAG triplet cytosine adenine guanosine

CaM Calmoduline

CaMK Calmoduline Kinase

CaN Calcineurine

CCCP Carbonyl cyanide m-chlorophenyl
hydrazone

CDK Cyclin Dependent Kinase

COX Cytochrome c oxydase

CRE cyclic AMP response element

CREB Cyclic-AMP response element
binding protein

D1 Dopamine receptor subtype 1

D2 Dopamine receptor subtype 2

DARPP-32 Dopamine-and cAMPRegulated
PhosphoProtein 32

DAT Dopamine transporter

DRP1 Dynamin-related protein 1

FAD Flavine Adénine Dinucléotide

FADH2 Reduced FAD

FCCP Carbonyl cyanide 4-
(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

ERAs espèces réactives de l'azote

EROs espèces réactives de l'oxygène

FIS1 Mitochondrial Fission 1

Fp Ferroprotein

FRET Förster Resonance Energy Transfer,

GABA Acide α -amino-butyrique

GBA Glucocerebrosidase coding gene

GFP Green fluorescent protein

GPCR G Protein Coupled Receptor

HAP1 Huntingtin associated protein 1

HDAC Histones Déacétylases

HIP1 Huntingtin interacting protein 1

HTT Huntingtine

Ip Iron sulfur protein

KA Kainate

KO Knock out

KI Knock in

LBs Lewy Bodies

LNs Lewy Neurites

LRRK2 Leucine-Rich Repet Kinase 2

LV Vecteur lentiviral

MFN MitoFusin

MH Maladie de Huntington

MP Maladie de Parkinson

MPTP 1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-
tétrahydropyridine

MSN Medium Spiny Neuron

mTOR Mammalian target of rapamycin

NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADH Reduced NAD

NES Nuclear Export Signal

NII Neuronal intranuclear inclusion

NLS Nuclear Localization Signal

NMDA N-Méthyl-D-Aspartate

NO Oxyde nitrique

NOS nitric Oxide synthase

OPA-1 Optic atrophy protein 1

PCR Polymerase Chain Reaction

PGC-1 α Peroxisome proliferator activator
receptor γ coactivator-1 α

PET Tomographie par emission de positons

PINK1 PTEN Induced Kinase
PI3K Phosphatidylinositol 3 kinase
PKA Protein Kinase A
PSD-95 Post synaptic density protein 95KDa
PTP Permeability Transition Pore
QA Quinolate
RE Réticulum endoplasmique
SDH Succinate déshydrogénase
SNC Système Nerveux Central
SNCA synucléine α coding gene
SNe Substance noire compacte
SNr Substance noire réticulée
STN Noyau sous thalamique
UPR Unfolded Protein Response
UPS Ubiquitin Proteasome System
WT Wild type
YAC Yeast artificial chromosome

Introduction à mes projets sur deux maladies neurodégénératives : la Maladie de Huntington et la Maladie de Parkinson

Tout au cours de mon expérience dans la recherche, mes travaux ont eu pour objectif d'améliorer la compréhension de mécanismes qui portent à la neurodégénérescence au cours des maladies auxquelles je me suis intéressée.

Dans ce manuscrit je me focalise sur les maladies de Huntington et de Parkinson. Ces deux maladies appartiennent à la classe des maladies du système extrapyramidal, un groupe de noyaux de substance grise dits centraux, impliqué dans le contrôle de l'exécution des mouvements. La maladie de Huntington, un syndrome hyperkynétique, et la maladie de Parkinson, un syndrome akineto-hypertonique, représentent d'un point de vue clinique les extrêmes opposés d'un éventail de manifestations cliniques qui caractérisent l'expression d'une dysfonction de ce système.

La maladie de Huntington est une maladie héréditaire monogénique, associée à la présence d'une mutation dans le gène *HTT*, sur le chromosome 4. La mutation consiste en l'expansion pathologique de la portion du gène contenant des triplets CAG.

La maladie de Parkinson est plus souvent une maladie sporadique ; différents facteurs de risque, environnementaux et génétiques pourraient déterminer l'apparition et l'évolution de la maladie. Dans une minorité des cas cette maladie est héréditaire, autosomique dominante ou récessive. Pour ces formes plusieurs *loci* et gènes ont été identifiés.

La composition en neurones de différents types, les nombreuses interconnexions réciproques et les différents systèmes de neurotransmission, sont certaines des caractéristiques du réseau des ganglions de la base qui déterminent leurs fonctions ainsi que leur vulnérabilité, comme la sensibilité accrue au stress oxydant, dont les mitochondries sont les acteurs principaux. D'autre part, les études *post mortem* et *in vivo* ont mis en évidence des dysfonctions métaboliques impliquant un rôle de la mitochondrie dans les cerveaux des patients atteints des deux maladies. Enfin des éléments en faveur d'un rôle d'une dysfonction mitochondriale dans la pathogénie de ces maladies ont été apportés par l'analyse de modèles animaux ou cellulaires.

Pendant toutes les années que j'ai dédiées à la recherche en tant que chercheur « post-doctorant », je me suis focalisée sur la compréhension des mécanismes qui lient la dysfonction mitochondriale à la neurodégénérescence, ce qui représente le sujet de ce manuscrit. Celui-ci est structuré en deux parties principales. L'introduction récapitule des notions essentielles, concernant les aspects fondamentaux des maladies de Huntington et de Parkinson, y compris la clinique – le point de départ de mon expérience de médecin et de chercheur – la génétique, la neuropathologie et les mécanismes pathogéniques communs aux maladies neurodégénératives. La description des mécanismes pathogéniques spécifiques à chaque maladie, liés aux fonctions de protéines impliquées, est aussi comprise dans l'introduction. La deuxième partie traite les aspects principaux de la physiologie mitochondriale dont la dysfonction a été impliquée dans la pathogénie de ces deux maladies ; elle comprend également les deux projets de recherche, Projets I et Projet II, sur lesquels j'ai travaillé pendant mes années de post-doctorat en France, mais qui s'appuient aussi sur les projets développés aux Etats-Unis.

Le premier projet (Projet I, article 1) est focalisé sur la caractérisation de la dysfonction du Complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des modèles animaux de Maladie de Huntington. L'étude de ce complexe a déjà suscité beaucoup d'intérêt chez les chercheurs dans le champ du métabolisme mitochondrial, de la neurodégénérescence et d'autres types de pathologies neurologiques tumorales chez l'homme ; les raisons de cet intérêt consistent dans le double rôle de ce complexe dans les cycles métaboliques - de Krebs et phosphorylation oxydative – et dans les mécanismes qui en règlent les fonctions, expression de la coordination entre les fonctions nucléaires et mitochondriales. Nous avons étudié de façon détaillée le rôle de la dysfonction de ce complexe dans plusieurs modèles rongeurs de Maladie de Huntington. Nos résultats indiquent que le défaut de ce complexe est important dans la pathogénie de cette maladie. Ils indiquent aussi qu'un effet de neuroprotection peut dériver de l'augmentation de l'expression du complexe, ouvrant une perspective thérapeutique dont la mitochondrie serait la cible.

Le deuxième projet II (Projet II, article 2) est consacré à l'étude des deux protéines le plus souvent associées aux formes autosomiques récessives à début précoce de la Maladie

de Parkinson, la Parkine et PINK1. Le rôle conjoint des deux protéines dans la régulation de certains aspects de la physiologie mitochondriale, tel que la mitophagie, a été clarifié au cours des dernières années. Leur fonction est aussi impliquée dans les processus de fusion et de fission mitochondriale, aspects à leur tour corrélés au contrôle de qualité de la mitochondrie.

Mon travail dans un modèle cellulaire contribue à mieux comprendre l'implication de la Parkine et de PINK1 dans la fission mitochondriale. Les résultats obtenus mettent en évidence une régulation de la fission mitochondriale par la Parkine, par son interaction avec la protéine Drp1, une GTPase avec un rôle primaire dans ce processus. Nous montrons que l'effet de la Parkine dépend de l'état de phosphorylation du résidu Ser 637 de Drp1. Mes résultats indiquent que la Parkine module la fission mitochondriale, au moins partiellement, indépendamment de PINK1. En revanche, en ce qui concerne la mitophagie les résultats obtenus par la technique de microscopie confocale dite de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) indiquent un rôle conjoint de Parkine et PINK1, éclairant les détails des interactions moléculaires et une coordination spatio-temporelle du recrutement mitochondrial de Parkine et Drp1 à proximité de PINK1 à la surface mitochondriale.

Ces travaux indiquent donc que Parkine interviendrait dans la régulation de la physiologie mitochondriale par plusieurs stratégies différentes, selon le contexte bioénergétique de la cellule.

Dans la partie Annexes, je présente deux articles supplémentaires qui représentent une partie considérable du travail de recherche réalisé dans les équipes du Dr Corti et du Dr Manfredi.

Les deux chapitres de ce manuscrit sont conçus et organisés dans le but de présenter une synthèse du bagage intellectuel et du savoir faire que j'ai acquis au cours de mes expériences professionnelles, et la discussion critique du rationnel et des aspects méthodologiques à la base des mes travaux de recherche. Cette organisation reflète l'évolution et les perspectives de mon expérience et est finalisée pour mettre en évidence la démarche intellectuelle acquise au cours de ces années de formation à la recherche par la recherche.

Chapitre 1. Introduction

I. Clinique et génétique des deux maladies

| | |
|--|-------|
| I.1 La Maladie de Huntington, MH | p. 11 |
| I.1.1 Définition, histoire, épidémiologie | p. 11 |
| I.1.2 Présentation clinique | p. 12 |
| I.1.3 Génétique : maladie de Huntington et maladies à expansion de trinucléotide | p. 16 |
| | |
| I.2 La Maladie de Parkinson, MP | p. 21 |
| I.2.1 Définition, histoire, épidémiologie | p. 21 |
| I.2.2 Présentation clinique | p. 22 |
| I.2.3 Etiologie de la MP | p. 31 |
| I.2.4 Génétique de la MP | p. 32 |
| I.2.4a Formes monogéniques dominantes | p. 35 |
| I.2.4b Formes monogéniques récessives | p. 36 |

I.1 La Maladie de Huntington, MH

I.1.1 Définition, histoire et épidémiologie

Longtemps connue sous le nom de chorée de Huntington, elle doit son nom à George Huntington, médecin américain qui fut le premier à la décrire en 1872. Cliniquement au cours de la MH le développement progressif de mouvements choréiques, traduisant l'atteinte préférentielle des neurones striataux, est associé à la détérioration des fonctions cognitives. Le début de la MH se situe entre 30 et 50 ans ; la mort survient généralement de 15 à 20 ans après le début ; à ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de ralentir l'évolution de la maladie.

La découverte du gène associé à la MH est due à la fondation d'un projet pour la caractérisation, clinique et génétique, des membres de familles MH, génétiquement apparentées entre eux, dans un village de pêcheurs le long de la frontière du lac de Maracaibo au Venezuela, où l'on avait observé une incidence extrêmement élevée de la maladie (Okun MS and Thommi N, 2004). Par l'analyse de liaison (*linkage*) de ces familles on est arrivé à la localisation et à l'isolement du gène "Interesting Target 15", *IT15*, situé sur le chromosome 4p16.3 (Gusella JF *et al.*, 1983), codant pour la protéine Huntingtine, dorénavant HTT, en 1993 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; pour une revue Borrel-Pages M *et al.*, 2006).

Des données très récentes d'épidémiologie viennent de l'étude de méta-analyse de Pringsheim (Pringsheim T *et al.*, 2012). L'incidence de la MH est de 0,38 pour 100.000 par an. La prévalence mondiale est de 2,71 pour 100.000, mais elle est en fait variable selon la population. La prévalence estimée dans l'ensemble des régions d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Australie est de 5,70 pour 100.000 (variable entre le 5 et le 10%). Une prévalence significativement plus faible a été relevée pour l'Asie, de 0,40 pour 100.000.

La prévalence de la MH pourrait augmenter, les nouvelles mutations étant censées représenter environ 10% des cas diagnostiqués (Falush D *et al.*, 2001).

I.1.2 Présentation clinique

La Maladie de Huntington, MH, est une maladie progressivement débilitante. Les symptômes et les signes les plus importants de la MH, sont liés aux problèmes moteurs, cognitifs et psychiatriques. Typiquement, une phase prodromique, caractérisée par un léger syndrome psychotique et des troubles du comportement, peut être observée chez les patients jusqu'à 10 ans avant la manifestation de la chorée. A ce cadre s'accompagnent souvent d'autres problématiques débilitantes, comme la perte involontaire de poids, les troubles du sommeil et du rythme circadien et la dysfonction du système nerveux autonome. L'âge moyen du début de la maladie est compris entre 30 et 50 ans, avec une très haute variabilité de 2 à 85 ans. La durée moyenne de la maladie est 17-20 ans. La cause la plus fréquente du décès est la pneumonie, suivi par le suicide.

Troubles du mouvement

Les mouvements choréïques, mouvements parasites, sont caractéristiques de la MH. Initialement, ils se produisent aux extrémités distales, les doigts et les orteils, mais aussi dans de petits muscles faciaux ; ces mouvements parasites peuvent être interprétés par les spectateurs comme signes de nervosité. Peu à peu, ils se propagent à tous les autres districts musculaires : de distal à proximal, et axial. Les plus évidents sont les mouvements d'extension des muscles longs du dos. Ils sont présents pendant toute la période de veille du patient.

Les mouvements involontaires au niveau du visage consistent dans le mouvement continu de certains muscles, par exemple un sourcil est levé, un œil fermé, la tête est courbée ou tournée tandis que la langue et les lèvres sont saillantes. Parler et déglutir deviennent progressivement plus problématiques menant à l'étouffement à tout moment chez certains patients.

D'autres mouvements indésirables comprennent les tics, assez rares et comparables à ceux observés dans le syndrome de Gilles de la Tourette.

Les signes d'hypo- et hypermétrie et les altérations de la marche, qui est très instable, sont comparables à ceux présents dans des syndromes cérébelleux.

La dystonie est aussi caractéristique de la MH, qui est produite par l'augmentation du tonus musculaire conduisant à une posture anormale et aggravant les troubles moteurs ; le torticolis mais aussi des rotations du tronc ou des membres. La dystonie devient plus importante avec la progression de la maladie, et prévaut sur la chorée dans les phases terminales.

Les patients peuvent développer une hypokinésie globale et une rigidité qui contrastent avec l'hyperkinésie segmentale : les patients hésitent à se lancer dans un mouvement et sont globalement ralentis dans toutes leurs activités. Dans les formes à début précoce la rigidité peut être le signe prévalent (variante de Westphal). Au fil du temps ces perturbations des mouvements rendent de plus en plus difficiles les activités quotidiennes comme sortir du lit, prendre une douche, s'habiller, faire sa toilette, nettoyer la maison, cuisiner et manger.

Troubles cognitifs, la démence

C'est un cadre de démence sous-corticale, le déclin cognitif impliquant généralement des difficultés de l'attention et des fonctions exécutives, c'est-à-dire les fonctions permettant de réaliser au quotidien les tâches complexes : mémoire de travail (ou à court terme), capacité d'initiation, attention et planification (Peavy GM *et al.*, 2010). La mémoire sémantique (ou à long terme) est relativement épargnée.

Avec l'évolution la maladie porte à la manifestation des troubles du langage (fluence verbale), visuo-perceptifs, de la commande des gestes (apraxie), de la cognition sociale.

Les patients font souvent des erreurs d'appréciation et ne réagissent pas de la manière que l'environnement attend.

Troubles psychiatriques

Les symptômes psychiatriques qui fréquemment se présentent dans les stades précoces de la maladie, ou même avant le début de symptômes moteurs consistent dans la combinaison des symptômes de la dépression, de l'apathie, de l'anxiété, des troubles obsessionnels compulsifs (pour une revue Roos RA, 2010). Lorsque il est déprimé le patient manifeste une estime de soi affaiblie, il perd du poids et devient inactif. L'anxiété est

causée par l'incertitude relative à la progression de la maladie. Obsessions et compulsions peuvent perturber la vie du patient et aussi mener à l'irritabilité et à l'agressivité. Il peut être difficile de discriminer l'apathie de la dépression.

L'apathie provoque perte d'intérêt et augmentation des comportements passifs. L'apathie est liée au stade de la maladie, tandis que l'anxiété et la dépression ne le sont pas.

Un syndrome psychotique de schizophrénie paranoïde avec des hallucinations acoustiques peut apparaître, plus souvent dans les derniers stades de la maladie. Dans la plupart des cas, cela va avec le déclin cognitif. Le suicide survient plus fréquemment chez les individus précocement symptomatiques et aussi chez les porteurs asymptomatiques. Le moment du test génétique et le stade où l'indépendance diminue sont les périodes les plus à risque de suicide (Walker FO, 2007).

Signes et symptômes secondaires

La perte involontaire de poids a été constatée chez tous les patients. Principalement secondaire à la chorée, elle est aussi une conséquence des problèmes pratiques du quotidien, comme la perte d'appétit et la difficulté à manipuler et à avaler les aliments. La perte de neurones hypothalamiques est également un facteur causal (Kremer HP *et al.*, 1991, Aziz NA *et al.*, 2007). Les troubles végétatifs, qui peuvent entraîner des attaques de transpiration abondante, ainsi que les troubles du sommeil et du rythme circadien sont aussi importants chez les patients atteints de MH (Arnulf I *et al.*, 2008).

La maladie de Huntington juvénile

La forme juvénile (Juvenile Huntington's Disease, JHD) se présente avant l'âge de 20 ans et représente 10% des cas de MH. Souvent la maladie débute avec des troubles du comportement et de l'apprentissage à l'école. Un syndrome hypokinétique et bradykinétique et des dystonies représentent le cadre clinique plus fréquent.

La chorée est rarement vue dans la première décennie, elle se présente plutôt pendant la deuxième décennie. Des crises d'épilepsie peuvent s'associer.

Causée dans la plupart de cas par plus de 60 répétitions de la triplet CAG, la forme juvénile est transmise par le père dans 75% des cas (Ridley RM *et al.*, 1988; Nance MA and Myers RH, 2001).

Diagnostic et diagnostic différentiel

Le diagnostic repose sur les signes et symptômes cliniques d'un grave trouble extrapyramidal du mouvement, chez une personne dont un parent est prouvé être atteint de MH. Parmi les formes héréditaires de chorée il faut aussi considérer : la chorée bénigne héréditaire ; la neuroacanthocytose ; l'atrophie Dentato-Rubro-Pallido-Luysiane (DRPLA) et la maladie de Wilson. Des formes de chorée héréditaire similaires à la MH (Huntington disease like, HDL) ont aussi été décrites (Wild TJ and Tabrizi SJ, 2007).

Le « Gold Standard » pour le diagnostic de MH est la démonstration de l'augmentation du nombre de triplets CAG d'au moins 36 sur le gène *IT15*. Le diagnostic peut devenir difficile lorsque le parent affecté n'est pas connu ou est décédé pour causes différentes. De fait un syndrome choréique peut se présenter dans une variété d'autres conditions pathologiques : i) maladies rhéumatiques (chorée de Sydenham et chorée gravidique) ; ii) maladies systémiques (thyrotoxicoses ; *Polycythemia vera* ; hyperglycémie ; syndromes paranéoplasiques et Lupus Erythematodes Systémique, SIDA); iii) suite à la prise de médicaments. La combinaison de l'histoire de la maladie et des tests de laboratoire aide au diagnostic différentiel.

I.1.3 Génétique : maladie de Huntington et maladies à expansion de trinuécléotides

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire de l'âge adulte ; elle est une maladie monogénique, autosomique dominante. Au moment de la découverte du gène, l'expansion de la répétition de la triplet CAG, a été identifiée sur un allèle du gène *IT15* (OMIM 613004) dans tous les membres atteints de MH des 75 familles examinées (The HD collaborative research group, 1993). La MH fait donc partie du groupe des maladies associées à l'expansion dynamique de trinuécléotides.

Entre les maladies à expansion des trinuécléotides, le **syndrome de l'X fragile** a été la première, en 1991, à être associée à la présence d'une expansion $(CGG)_n$ non codante dans le **gène FMR1** (Oberle I *et al.*, 1992; Fu YH *et al.*, 1991; Verkerk AJ *et al.*, 1991), introduisant le nouveau concept que certaines parties du génome nucléaire sont instables et plus susceptibles à expansions. Cette instabilité est retenue responsable de la manifestation de cadres cliniques variables selon l'entité de l'expansion.

Les maladies à mutations instables (expansions et délétions) peuvent être dues à différents types de répétitions : des trinuécléotides (maladies à polyglutamines, Ataxie de Friedreich, dystrophie myotonique 1, DM1), des tétranuécléotides (dystrophie myotonique 2, DM2), des pentanucléotides (ataxies spinocérébelleuses de type 10 et de type 31, SCA10 et SCA31 pour « SpinoCerebellar Ataxia » 10 et 31), des hexanucléotides (Démence Fronto-Temporale, FTLN pour « Fronto-Temporal-Lobar Degeneration », dominante, Sclérose Latérale Amyotrophique, SLA, et SLA-FTLN) des dodécamères (épilepsie myoclonique progressive, EPM1 pour « Epilepsy Progressive Myo-clonique ») ou des mégasatellites (dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale, FSHMD1A, pour « FacioScapuloHumeral Muscular Dystrophy 1A »).

La majorité des maladies à mutations instables est liée à des expansions de trinuécléotides, codants ou non codants (Fig. 1).

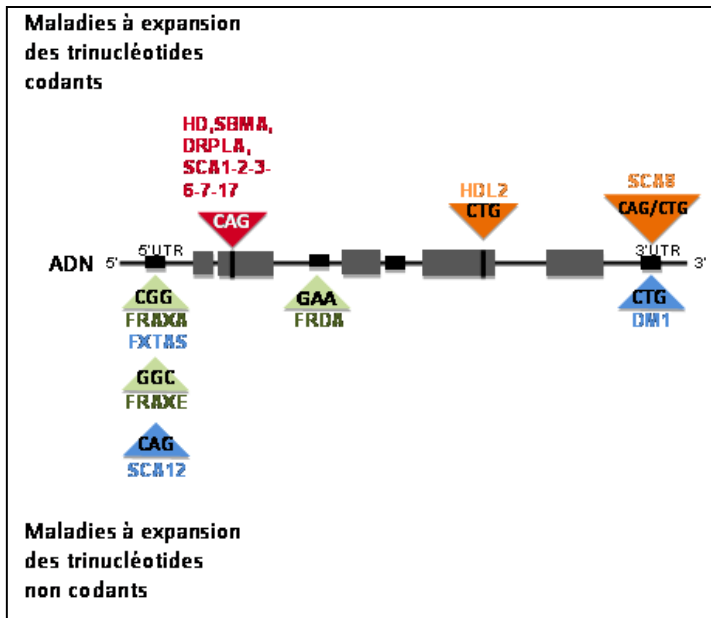


Figure 1 (basée sur les travaux de Geraldine Sicot) : schéma représentatif de la distribution des séquences des trinuécléotides dont l'expansion est responsable de troubles héréditaires. Les maladies à expansion des trinuécléotides, codants ou non codants, sont représentées, respectivement, en haut ou en bas d'un gène virtuel.

FRA(X)A (*FMRI*, FRA(X)(q27.3)) : syndrome de l'X Fragile ; FXTAS : syndrome de l'X Fragile, Tremblement et Ataxie ; FRA(X)E (*FMR2*, FRA(X)(q28) E) : Fragile X syndrome ; SCAs (Ataxies Spino-Cerebelleuses) ; DM1 : Dystrophie Myotonique 1 ; HD : maladie d'Huntington (Huntington's Disease) HDL 2 : syndrome dominant à phénotype MH, type 2 (Huntington's Disease Like) ; SBMA : Atrophie Musculaire Spinale et Bulbaire pour « Spinal and Bulbar Muscular Atrophy » ; DRPLA : Atrophie Dentato-Rubro-Pallido-Louysiane.

En orange et bleu sont indiquées les maladies pour lesquelles un mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN est impliqué.

Les mutations sont dites non codantes lorsque l'expansion des triplets se présente dans un intron ou dans les séquences 5' et 3' non traduites. Généralement il s'agit d'expansions dans le répétitions (CGG)_n, (CTG)_n, (GAA)_n.

L'amplification des trinuécléotides non-codants peut avoir deux implications pathologiques principales : soit une perte de fonction du gène muté (c'est le cas par exemple de la FRDA), soit un gain de fonction délétère des ARN amplifiés (c'est le cas par exemple de la DM1). Au cours de la DM1 (prototype de la toxicité des ARN amplifiés), les transcrits non-codants résultent toxiques pour la cellule et perturbent la localisation et/ou la fonction des protéines qui lient l'ARN (à l'image des familles MBNL et CELF) en réglant l'épissage et le métabolisme ; les défauts qui en dérivent, d'épissage,

de transcription ou même de maturation des miRNA, représentent des mécanismes d'importance primaire au cours de la pathogénie de ces maladies. Dans certains cas (par exemple DM1) l'accumulation des ARNs non codants provoque la formation de *foci* intranucléaires d'ARN, au niveau desquels les protéines régulatrices de l'épissage s'accumulent et y sont ainsi inactivées (pour une revue Sicot G and Gomes-Pereira M, 2013).

Les mutations dynamiques sont dites codantes quand elles sont localisées dans un exon. Il s'agit normalement d'expansions de taille modérée des trinuécléotides (CAG)_n ou (GCG)_n, ayant pour conséquence des expansions de polyGlutamine (polyQ) ou de polyAlanine dans les protéines correspondantes.

Le tableau 1 montre les maladies à expansions de polyGlutamine (polyQ).

| Disease | Protein | Repeat | Normal repeat length | Pathogenic repeat length | Inclusions | Brain regions most affected |
|--|---|--------|----------------------|--------------------------|-----------------------|--|
| <i>Typical polyglutamine diseases (gain of function)</i> | | | | | | |
| HD | Huntingtin | CAG | 6–34 | 36–121 | Nucleus and cytoplasm | Striatum, cerebral cortex |
| SBMA | Androgen receptor | CAG | 9–36 | 38–62 | Nucleus and cytoplasm | Anterior horn and bulbar neurons, dorsal root ganglia |
| DRPLA | Atrophin 1 | CAG | 7–34 | 49–88 | Nucleus | Cerebellum, cerebral cortex, basal ganglia, Luys body |
| SCA1 | Ataxin 1 | CAG | 6–39 | 40–82 | Nucleus | Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, brainstem |
| SCA2 | Ataxin 2 | CAG | 15–24 | 32–200 | Nucleus | Cerebellar Purkinje cells, brain stem, frontotemporal lobes |
| SCA3 | Ataxin 3 | CAG | 13–36 | 61–84 | Nucleus | Cerebellar dentate neurons, basal ganglia, brain stem, spinal cord |
| SCA7 | Ataxin 7 | CAG | 4–35 | 37–306 | Nucleus | Cerebellum, brain stem, macula, visual cortex |
| SCA17 | TATA box binding protein | CAG | 25–42 | 47–63 | Nucleus | Cerebellar Purkinje cells, inferior olive |
| <i>Atypical polyglutamine disease (mimicked by missense mutation)</i> | | | | | | |
| SCA6 | α1a voltage-dependent calcium channel subunit | CAG | 4–20 | 20–29 | Cytoplasm | Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, inferior olive |
| <i>Atypical polyglutamine disease (reverse transcription of CTG repeats)</i> | | | | | | |
| SCA8 | Unknown | CTG | 16–34 | >74 | Nucleus | Cerebellar Purkinje cells, granule cells, inferior olive |

Tableau 1 (d'après Shao J and Diamond MI, 2007) : description succincte des maladies à polyQ.

Sauf la SBMA, ou maladie de Kennedy, liée au chromosome X, il s'agit de maladies à transmission autosomique dominante.

Les différents gènes impliqués sont d'expression le plus souvent ubiquitaire et, *a priori*, ne présentent pas de lien fonctionnel direct entre eux.

Le phénomène de l'anticipation et le concept de seuil pathologique

La découverte des mutations dynamiques a permis d'expliquer le phénomène de l'anticipation clinique : les symptômes se manifestent plus précocement et sont plus sévères au cours des générations successives.

Les gènes responsables des maladies à expansion de trinuécléotides ont à l'état normal un nombre donné de répétitions du triplet impliqué. Le nombre de ces répétitions est polymorphe dans la population générale et chaque personne possède un nombre de triplets qui lui est propre.

Un allèle est dit normal lorsqu'il possède un nombre de répétitions inférieur à un certain seuil limite, spécifique à chaque gène. A partir d'un certain nombre de répétitions les expansions deviennent instables et ont tendance à subir une expansion intergénérationnelle dans la gamme pathologique. Au delà de ce nombre de répétitions le phénotype de la maladie se manifeste, on dit alors que l'allèle est pathogénique ou muté.

Le nombre de répétitions peut varier d'une génération à l'autre à cause de l'instabilité de la transmission maternelle et paternelle. Ces mécanismes peuvent expliquer le phénomène de l'anticipation.

De fait l'existence d'une corrélation inverse entre le nombre de répétitions polyQ, l'âge du début et la sévérité, soit la vitesse de l'évolution, des maladies à expansion des triplets a été suggérée (David G *et al.*, 1998; Gusella JF and MacDonald ME, 2000). En effet, pour la MH, les allèles normaux contiennent environ 20 triplets et les allèles pathogéniques ont plus de 36 répétitions. Au-delà du seuil de 36 glutamines, la probabilité de manifester la pathologie est élevée. Entre 27 et 35 triplets, il existe une instabilité chez le porteur. Récemment, l'étude PHAROS, une analyse longitudinale des sujets porteurs d'un allèle HTT de taille intermédiaire, a montré que des troubles marqués du comportement, y compris idées suicidaires et apathie, sont plus fréquents chez ces sujets en comparaison aux contrôles (Killoran A *et al.*, 2013).

Toutefois, pour un même nombre de répétitions, on observe de fortes variations inter-individuelles de l'âge d'apparition des symptômes. Le nombre de répétitions ne rend compte que partiellement de la variabilité de l'âge du début, suggérant l'existence d'autres facteurs génétiques ou environnementaux modulant la sévérité de la maladie.

L'instabilité génomique pourrait fonctionner également à un niveau intra-individuel, par exemple les études de modèles animaux et cellulaires et de cerveaux de patients ont documenté un mosaïcisme somatique de la longueur de répétition CAG dans les neurones différenciés (Gonitel R *et al.*, 2008, et références y contenues). La compréhension de ce phénomène fournit une explication de plus à l'extrême variabilité dans la présentation clinique et ainsi une possible source d'erreur dans l'évaluation génétique : le nombre des triplets mesuré dans les tissus périphériques (lymphocytes) d'un individu pourrait ne pas correspondre exactement au nombre de triplets dans les tissus neuronaux.

I.2 La maladie de Parkinson, MP

I.2.1 Définition, histoire, épidémiologie

La maladie de Parkinson, MP, est une maladie de l'âge adulte, caractérisée pathologiquement par la dégénérescence progressive, bilatérale de la voie nigro-striée, dont la cause est, dans la majorité des cas, inconnue.

Le premier à en donner une description clinique fut James Parkinson dans son «Un essai sur la paralysie agitante», apparu en 1817. Plus tard Charcot reconnaissait des formes de la maladie sans tremblement et soulignait à juste titre que la lenteur des mouvements, la bradykinésie, caractéristique de la maladie doit être distinguée de la faiblesse ou «pouvoir musculaire amoindri», comme à l'origine était désignée la maladie de Parkinson (Kempster PA *et al.*, 2007). Ehringer et Hornykiewicz en 1960 (Bjorklund A and Dunnett SB, 2007; Hornykiewicz O, 2006) découvrirent que les concentrations de dopamine sont nettement diminuées dans le striatum de patients atteints de la MP. Cette découverte a ouvert la voie pour les premiers essais thérapeutiques, l'année suivante (Birkmayer W and Hornykiewicz O, 1961). Effectivement la lévodopa injectée chez les patients parkinsoniens améliorait l'akinésie ; une formulation de lévodopa administrée par voie orale a fait son apparition plus tard dans la décennie (Birkmayer W and Hornykiewicz O, 1998; Cotzias GC *et al.*, 1969).

Dans l'histoire plus récente la recherche s'est focalisée sur les facteurs contribuant à la mort des cellules dopaminergiques et non-dopaminergiques dans le cerveau des patients atteints de MP : des facteurs environnementaux ainsi que, dans les plus rares formes familiales de la maladie, des mutations dans des gènes, dont la fonction est maintenant connue, ont été identifiés. Ces découvertes ont permis la modélisation de la maladie, ainsi que l'étude et la compréhension de certains mécanismes pathogéniques responsables de l'atteinte neuronale. La prévalence estimée pour la MP est d'environ 1% dans la population âgée de 60 ans et plus (de Lau LM and Breteler MM, 2006). Le taux de prévalence augmente avec l'âge ; la plus haute prévalence signalée étant d'environ 4% (Wright Willis A *et al.*, 2010; de Rijk MC *et al.*, 1997).

I.2.2 Présentation Clinique

Quatre traits cliniques principaux sont distingués chez les malades de MP ; ces traits peuvent être regroupés sous l'acronyme TRAP : tremblement au repos, rigidité, akinésie et instabilité posturale. En outre, la posture fléchie et les phénomènes de bloc moteur (freezing) ont été inclus parmi les caractéristiques classiques de la MP.

En plus des classiques troubles du mouvement, dans chaque patient il faut distinguer les troubles non moteurs. De fait les dysfonctions du système autonome, les troubles cognitifs et comportementaux, tout comme les troubles sensitifs et du sommeil sont souvent sous évalués et constituent une partie du cadre clinique de la MP (Zesiewicz TA *et al.*, 2006).

Troubles du mouvement

Bradykinésie et akinésie

La bradykinésie, le ralentissement des mouvements, et l'akinésie, la difficulté à initier les mouvements sont caractéristiques de la MP ; ces troubles rendent difficiles les activités quotidiennes. Les phénomènes de hypomimie (perte d'expression), dysarthrie, hypophonie, dysphagie et sialorrhée sont considérés comme des manifestations de la bradykinésie orofaciale-laryngée. Les mouvements réclamant de la précision, comme l'écriture, et les mouvements semi-automatiques sont aussi affectés, produisant par exemple la micrographie et la perte du ballant d'un bras pendant la marche (Hunker CJ *et al.*, 1982; Cooper JA *et al.*, 1994; Giovannoni G *et al.*, 1999; Bagheri H *et al.*, 1999).

Comme les autres troubles du mouvement au cours de la MP, la bradykinésie varie selon l'état émotionnel du patient. L'excitation émotionnelle provoque la 'kinésie paradoxale' : les patients deviennent capables de mouvements très rapides (attraper une balle et même courir si quelqu'un crie "feu"), ce qui suggère que les patients ont besoin d'une stimulation externe pour accéder aux programmes moteurs autrement intacts.

La bradykinésie propre à la MP a été mise en corrélation avec le degré de déficience en dopamine (Vingerhoets FJ *et al.*, 1997).

Tremblement

Selon la présence ou l'absence de tremblement on distingue deux formes cliniques différentes de MP : la MP avec tremblement et la MP akineto-rigide.

Dans la forme avec tremblement, il s'agit d'un tremblement de repos, qui disparaît classiquement avec l'action et pendant le sommeil. Il a une fréquence comprise entre 4 et 6 Hz, et il est prononcé aux extrémités. Le tremblement de la main est le plus typique, décrit comme un mouvement de supination-pronation ("laminage des pilules"), asymétrique. Le tremblement peut également impliquer la bouche, le menton, la mâchoire et les jambes, mais rarement le cou/tête ou la voix, contrairement à ce que l'on observe chez les patients atteints de tremblement essentiel.

Des tremblements semblables à ceux du tremblement essentiel peuvent se produire chez les patients parkinsoniens des décennies avant l'apparition de la maladie et sont considérés comme un facteur de risque.

Rigidité

La rigidité est caractérisée par une résistance accrue au mouvement passif d'un membre (flexion, extension ou rotation autour d'une articulation). Souvent la rigidité est accompagnée par le phénomène de la "roue dentée", en particulier lorsqu'elle est associée à un tremblement sous-jacent. Ces phénomènes sont accentués lorsque l'on demande au patient de faire un geste continu avec une main et en même temps l'on imprime le mouvement passif du membre controlatéral (manœuvre de Froment).

Altérations posturales

Celles ci peuvent résulter de la rigidité, surtout axiale : au niveau du cou et du tronc on peut observer alors des phénomènes d'extrême flexion comme la 'dropped head', la camptocormie (présent aussi dans les dystonies et dans les myopathies des muscles extenseurs du tronc), la scoliose et la flexion permanente des coudes et des genoux.

La posture fléchie se produit généralement vers la fin de la maladie.



Figure 2. Posture camptocormique

La rigidité permanente conduit à d'autres malformations des membres comme la 'main striatale', par déviation ulnaire de la main, la flexion des articulations métacarpophalangiennes et l'extension des articulations interphalangiennes proximales et la flexion des distales, et l'orteil striatal', caractérisé par l'extension ou la flexion.

Instabilité posturale

L'instabilité posturale est due à la combinaison de la perte des réflexes posturaux et des autres troubles non-moteurs, tels que l'hypotension orthostatique, et l'incapacité à intégrer les afférences sensorielles (visuelles, vestibulaires et proprioceptives) (Bloem BR, 1992; Bronte-Stewart HM *et al.*, 2002).

L'instabilité posturale survient généralement après l'apparition des autres signes cliniques, au cours des phases finales de la MP.

L'instabilité posturale (et le bloc de la marche) est la cause la plus fréquente des chutes et détermine un risque augmenté de fractures de la hanche (Williams DR *et al.*, 2006).

Blocs moteurs, ou Freezing

Les blocs moteurs sont une forme d'akinésie ; toutefois ils ne se présentent pas universellement au cours de la MP (Bloem BR *et al.*, 2004)

Ils sont moins fréquents lorsque le tremblement est le symptôme prévalent (Macht M *et al.*, 2007). Plus souvent le freezing concerne les jambes pendant la marche. Il s'agit d'une incapacité soudaine et transitoire (autour de 10 secondes) de marcher. Il peut se manifester comme hésitation à initier la marche ou comme un blocage dans des situations spécifiques, par exemple traverser un passage étroit.

Autres troubles du mouvement

Dans certains cas, l'activité volontaire des muscles d'une partie du corps provoque l'apparition des mouvements involontaires dans la partie homologue controlatérale.

Ceux-ci sont appelés ‘mouvements miroirs’, observables dans les phases précoces de la MP.

L’akathisie, une agitation psychomotrice, peut être présente (Comella CL and Goetz CG, 1994).

Des anomalies des mouvements de poursuite oculaire, des saccades et des anti-saccades sont aussi observables et sont corrélées à la progression de la maladie (Rascol O *et al.*, 1989). Ces anomalies sont accompagnées par d’autres troubles neuro-ophtalmologiques comme la diminution du ‘blink rate’, l’irritation de la surface oculaire, l’altération du film lacrymal, le blépharospasme et une diminution de la convergence (Biousse V *et al.*, 2004). Des troubles de la respiration peuvent se présenter au cours de la MP ; ces troubles sont associés à l’augmentation de la morbidité et de la mortalité observées au cours de la MP ; ils peuvent aussi dériver de la dyskinésie compliquant typiquement la thérapie avec la levodopa (Shill H and Stacy M, 1998).

L’apparition des réflexes primitifs, comme le réflexe glabellar ou palmomentonnier est typique de la MP.

Symptômes non moteurs

Dysfonctions du système nerveux autonome

Les troubles dysautonomiques, y compris l’hypotension orthostatique, l’excessive sudation, les dysfonctions sphinctériens et érectiles (Senard JM *et al.*, 1997; Swinn L *et al.*, 2003) peuvent se présenter au début de la MP.

Troubles cognitifs et neurocomportementaux

Les troubles neuropsychiatriques communs au cours de la MP sont la dépression, l’apathie, l’anxiété et les hallucinations et peuvent être autant débilissants que les symptômes moteurs (Aarsland D *et al.*, 2007).

D’autres symptômes neuropsychiatriques sont représentés par des comportements de type obsessionnel-compulsif et impulsif (Miyasaki JM *et al.*, 2007). Ces comportements peuvent être la conséquence d’un syndrome de dérégulation de la dopamine, qui suit l’utilisation des médicaments dopaminergiques.

Le déclin cognitif et la démence sont aussi communs au cours de la MP (Hely MA *et al.*, 2005; Aarsland D *et al.*, 2001).

Troubles du sommeil

Les troubles du sommeil (comme la somnolence excessive), qui dans le passé étaient attribués à la pharmacothérapie de la MP, sont maintenant considérés comme une partie intégrale du cadre clinique de la maladie. De plus, les troubles de la phase REM (pour Rapid Eye Movement) du sommeil peuvent représenter un facteur de risque et être des symptômes du syndrome pre-parkinsonien (Schenck CH *et al.*, 1996; Comella CL, 2007). Les troubles du sommeil observés au cours de la MP sont possiblement corrélés à la perte des neurones à hypocretine (orexin) (Fronczek R *et al.*, 2007; Thannickal TC *et al.*, 2007).

Anomalies sensorielles

Des troubles sensoriels comme les dysfonctions olfactives (hyposmie), la douleur, les paresthésies, sont fréquents mais souvent sous-estimés au cours de la MP (Stern MB *et al.*, 1994; Ford B *et al.*, 1996; Djaldetti R *et al.*, 2004; Tinazzi M *et al.*, 2006). Les dysfonctions olfactives peuvent être un marqueur précoce de la MP (Ponsen MM *et al.*, 2004).

Critères diagnostiques et échelles d'évaluation clinique

Dans la pratique clinique le diagnostic de MP est basé sur l'association de i) la présence de la combinaison des symptômes moteurs cardinaux (TRAP), ii) l'absence des symptômes d'exclusion, et iii) la réponse à la thérapie avec la levodopa (Gelb DJ *et al.*, 1999; Jankovic J, 2008).

Il manque de fait un test diagnostique définitif.

A l'autopsie, la confirmation est donnée par l'évidence neuropathologique de l'extensive perte neuronale et la présence de corps et neurites de Lewy (Lewy bodies, LBs ; Lewy neurites LNs), qui représentent les stigmates histologiques de la MP (Agid Y *et al.*, 1993; Hornykiewicz O, 1988; Jellinger K, 1987; Gibb WR and Lees AJ, 1989).

Plusieurs échelles d'évaluation clinique pour les patients atteints de MP ont été développées.

La MDS-UPDRS (Movement Disorder Society - Unified Parkinson Disease Rating Scale), qui comprend quatre échelles pour l'évaluation (1) des activités non motrices de la vie quotidienne, (2) des activités motrices de la vie quotidienne, (3) du système moteur (4) des troubles du mouvement qui surgissent à la suite de la prise de médicaments.

L'échelle modifiée de Hoehn et Yahr, pour l'évaluation de la sévérité globale de la maladie, et l'échelle pour l'évaluation des symptômes non-moteurs (Non Motor Symptoms Scale, NMSS) sont aussi très utilisées

Toutefois il faut rappeler que d'autres échelles d'évaluation existent comme par exemple :

Scales for Outcomes in Parkinson's disease-Motor (SCOPA-M),

Berg Balance Scale; PD Sleep Scale;

Clinical Impression of Severity Index for PD (CISI-PD); PDQ-39; and EQ-5D.

Diagnostic différentiel

Les syndromes parkinsoniens peuvent être classifiés en quatre types : a) la Maladie de Parkinson, MP, idiopathique ou primaire, considérée une condition dégénérative et sporadique ; b) les syndromes parkinsoniens acquis ou symptomatiques, secondaires à des accidents cérébraux, vasculaires ou traumatiques, à des infections, à la prise de médicaments et à l'effet toxique de substances spécifiques ; c) les formes hérédodégénératives de la maladie, ou Maladie de Parkinson Familiale, MPF, associées à des mutations dans certains gènes ; d) les syndromes parkinsoniens qui se manifestent au cours d'autres conditions neurodégénératives, comme l'atrophie multi-systémique (Multiple System Atrophy, **MSA**), la paralysie supranucléaire progressive (Progressive Supranuclear Palsy, **PSP**), la démence à corps de Lewy (Dementia with Lewy Bodies, **DLB**) et la dégénérescence corticobasale (Cortico-Basal Degeneration, **CBD**) (Poewe W and Wenning G, 2002).

Rarement un doute diagnostique survient lorsque l'on doit différencier la MP de conditions comme la démence fronto-temporale avec 'parkinsonisme', liée au chromosome 17 (Fronto Temporal Dementia with Parkinsonism Linked to chromosome

17, FTDP 17), la maladie de Pick, le complexe Parkinson- Démence de Guam, la dégénérescence pallido-nigrale (y compris la maladie de Hallervorden-Spatz et la dégénérescence dento-rubro pallidale), et enfin les maladies de Wilson et de Huntington. La distinction entre une MP idiopathique et un parkinsonisme du groupe (b) se fait à l'aide de l'histoire de la maladie, des tests de laboratoire et des techniques d'imagerie cérébrale.

En revanche, différencier une forme idiopathique de la MP des syndromes parkinsoniens du groupe (d) peut être plus difficile. La liste détaillée des critères diagnostiques va au-delà des finalités de ce manuscrit. Toutefois certains principes qui permettent de distinguer ces différentes entités nosologiques sont intéressants et sont inclus dans cette section.

Au cours de la **MSA avec parkinsonisme, MSA-P**, un syndrome parkinsonien est présent dans 80% des cas (Wenning GK *et al.*, 1994) ; 30% de patients avec ce syndrome répondent, comme dans la MP, à la thérapie avec la levodopa, mais les troubles causés par la dysfonction autonome prédominent dans la MSA en comparaison avec la MP.

Au cours de la **PSP** ou maladie de **Steele Richardson Olzewski** une tau-pathie, les stigmates cliniques sont 1- le syndrome parkinsonien, qui répond faiblement au traitement avec la L-Dopa, 2- l'ophtalmoplégie supra-nucléaire (une paralysie du regard dans les directions verticales qui précède la paralysie dans les directions horizontales), 3- les chutes récurrentes, 4- la démence. Chez les patients atteints de PSP un syndrome pseudobulbaire peut aussi être observé, avec dysarthrie et dysphagie associées aux brusques éclats de rire ou de larmes.

Dans la **DLB** par exemple, les patients présentent une démence plus souvent associée à des phénomènes hallucinatoires, et plus rarement au tremblement typique de la MP.

Au cours de la **CBD** l'atteinte du cortex fronto-pariétal et de plusieurs régions sous-corticales (la voie nigro-striée, le thalamus, les noyaux sub-thalamique, pallidum, rouge et dentelé) se manifeste comme un syndrome parkinsonien akineto-rigide associé à d'autres troubles, comme le myoclonus et la dystonie.

Normalement, les manifestations de la dégénérescence corticale aident à distinguer entre la CBD et la MP. Celles-ci comprennent l'apraxie, la dysphasie et les troubles sensitifs; ou encore un syndrome du lobe frontal, avec désinhibition, apathie, impulsivité (Wenning GK *et al.*, 1998). Une démence, fronto-temporale, peut aussi être présente (Kertesz A *et al.*, 2000).

Les études de corrélation génotype-phénotype ont permis de définir des traits cliniques distinctifs et des 'patterns' de neurodégénérescence caractéristiques à chacune des formes de MPF du groupe (c), contribuant ainsi à la définition des fonctions des gènes impliqués. Des particularités cliniques et des informations générales sur la structure des gènes sont comprises dans cette section; la fonction de ces gènes sera traitée dans la section V- Mécanismes pathogéniques au cours de la MP.

Dans la MPF associée aux mutations de **SNCA** la maladie a une évolution rapide, souvent compliquée par la démence.

Le tremblement des jambes est fréquemment observé chez les patients atteints de MPF liée à mutations du gène **LRKK2** (Healy DG *et al.*, 2008a).

Le début précoce est typique des formes récessives liées aux mutations des gènes **PARK2**, **PINK1** et **DJI** ; les cas associés à mutations des gènes **PARK2** et **DJI** ont aussi une évolution plus lente.

Dans les patients avec des mutations du gène **PARK2** la dystonie et l'hyperreflexie peuvent aussi être observées (pour une revue Wider C and Wszolek ZK, 2007).

Les cas associés au gène **PINK1** peuvent manifester des troubles psychiatriques et cognitifs (Steinlechner S *et al.*, 2007; Li Y *et al.*, 2005).

Blépharospasme, dystonie des jambes, et troubles psychologiques sont des caractéristiques additionnelles observables dans les cas de MPF associés aux mutations de **DJI** (Kumar KR *et al.*, 2011).

Des mutations dans le gène **ATP13 A2** sont associées à l'apparition d'un syndrome de Kufor-Rakeb, un syndrome parkinsonien compliqué par la présence de signes d'atteinte du système pyramidal, des troubles cognitifs, de la paralysie des mouvement oculaires de verticalité et du minimyoclonie facial-faucial-finger (Behrens MI *et al.*, 2010).

Enfin, l'imagerie cérébrale de routine peut fournir des informations sur les causes d'un syndrome parkinsonien. Par exemple l'imagerie à résonance magnétique (IRM) peut montrer des différences avec la CBD (atrophie corticale asymétrique), le parkinsonisme vasculaire (infarctus striataux et changements dans la substance blanche sous-corticale et périventriculaire), la maladie de Wilson (hyperintensités des ganglions de la base), les calcifications des ganglions de la base, l'hydrocéphale, les tumeurs cérébrales.

Encore, la dégénérescence strio-nigrique (un type de MSA) présente une atrophie du putamen ; l'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse, comprise entre les sous-types de MSA lorsque elle se manifeste de manière sporadique, présente des changements au niveau du pont et du cervelet ; la PSP présente une atrophie du mésencéphale.

Les techniques d'imagerie fonctionnelle ont été utilisées extensivement pour distinguer la MP des autres conditions extrapyramidales et pour définir des caractéristiques métaboliques spécifiques de la MP.

Toutefois les changements ici décrits peuvent ne pas être prononcés ; par conséquent le diagnostic correct se pose sur la base de la combinaison de l'histoire de la maladie, des critères cliniques, radiologiques et pathologiques.

I.2.3 Etiologie de la MP

Jusqu' en 1997 la MP été considérée comme l'archétype des maladies non génétiques. Plusieurs observations favorisaient cette opinion : 1) l'exposition à la 1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine (MPTP) pouvait causer un parkinsonisme (Langston JW and Ballard PA, 1983) ; 2) après la Première Guerre mondiale la diffusion de la grippe avait déclenché une épidémie compliqué par un syndrome parkinsonien post-encéphalique (Post Encephalytic Parkinsonian Syndrome, PEP) (Casals J *et al.*, 1998) ; 3) les études sur les jumeaux manquaient de concordance (Tanner CM *et al.*, 1999).

Par conséquent l'hypothèse que les **facteurs environnementaux** jouent un rôle déterminant dans la pathogénie de la MP a prévalu pendant des décennies. En raison de la ressemblance structurale entre le métabolite actif du MPTP, le MPP+, avec certains pesticides (Langston JW and Ballard PA, 1984) les scientifiques ont orienté leur intérêt vers la recherche de potentielles neurotoxines environnementales.

De fait la prévalence de la maladie est plus élevée dans les régions hautement industrialisées et dans les zones rurales où insecticides et pesticides sont largement utilisés. (Tanner CM, 1989). Aux Antilles françaises des toxines alimentaires ont aussi été mises en cause depuis la découverte que la consommation des fruits et des feuilles de certaines plantes de la famille des *Annonaceae* était liée à l'apparition d'un syndrome parkinsonien atypique (Caparros-Lefebvre D and Elbaz A, 1999)

Le **vieillessement** a aussi été mis en cause dans la pathogénie de la MP, le risque de développer la maladie étant significativement accru après la sixième décade, de 0,3 % dans la population générale à 2% des personnes âgés de plus de 65 ans (de Rijk MC *et al.*, 1997; Lang AE and Lozano AM, 1998).

I.2.4 Génétique de la MP

1997 marque le début de l'ère génétique dans la recherche sur la MP, avec la découverte que dans une grande famille italo-américaine la MP était associée à la présence d'une mutation faux-sens transmise de manière autosomique dominante dans le gène *SNCA*, localisé sur le chromosome 4 codant pour la protéine α -synucléine (Polymeropoulos H *et al.*, 1996 and 1997). Rapidement après MG Spillantini démontrait que l' α -synucléine est un composant principal des corps de Lewy (Lewy Bodies, LBs), la signature pathologique dans les cas sporadiques et héréditaires de MP (Spillantini MG *et al.*, 1997). La découverte d'un gène donnait donc la clef pour la compréhension des mécanismes pathogéniques associés à la MP.

Depuis, l'étude des rares grandes familles avec un syndrome parkinsonien hérité de façon clairement mendélienne (<10%), plusieurs gènes ont été identifiés qui sont associés de façon univoque aux formes monogéniques de la MP (*SNCA*, *LRKK2*, *PARK2*, *PINK1*, *DJI*, *ATP13A2*). Des gènes et loci additionnels ont été associés aux formes dominantes: *VPS 35* ou *PARK 16* (Vilarino-Guell C *et al.*, 2011; Zimprich A *et al.*, 2011) ; *UCH-L1* (Leroy E *et al.*, 1998) ; *HTRA2* ou *PARK 13* (Strauss KM *et al.*, 2005; Ross OA *et al.*, 2008) ; *GIGYF2* candidat au locus *PARK 11* (Lautier C *et al.*, 2008) ; toutefois leur association univoque aux formes monogéniques est encore débattue (pour revue Corti O *et al.*, 2011; Trinh A and Farrer M, 2013; Houlden H and Singleton AB, 2012; Kumar KR *et al.*, 2011; Martin I *et al.*, 2011).

En outre, les études de GWAS ont révélé que des variantes d'autres gènes (*GBA*, *HLA-DRA*, *BST1*, *MAPT*, *GAK-DGKQ*, *PARK16*) peuvent être associées à des cas de MPF dominante ou récessive. On parle dans ces cas de gènes qui confèrent un risque augmenté de MP. D'autre part les mêmes gènes responsables des formes monogéniques peuvent également être retrouvés mutés dans des cas sporadiques, conférant eux aussi un risque augmenté de développer la MP (*SNCA et LRKK2*) (pour revue Corti O *et al.*, 2011; Trinh A and Farrer M, 2013; Houlden H and Singleton AB, 2012; Kumar KR *et al.*, 2011; Martin I *et al.*, 2011).

De plus un syndrome parkinsonien monogénique est aussi visible dans le contexte des syndromes complexes, dominants et récessifs. C'est le cas, par exemple, des syndromes associés à des mutations dans les gènes *phospholipase A2* ou *PLA2G6* ou *PARK 14* et *PANK2*, au cours desquels l'on observe l'accumulation neuronale de fer (Neuronal Brain Iron Accumulation, NBIA) (Paisan-Ruiz C *et al.*, 2009; Thomas M *et al.*, 2004; Zhou B *et al.*, 2001; Morgan NV *et al.*, 2006). Le gène *FBXO7*, locus *PARK15*, codant pour la protéine 7 de la famille de protéines F-box a été associé avec un syndrome parkinsonien-pyramidal (PPS) (Di Fonzo A *et al.*, 2009). Les gènes associés aux ataxies spinocérébelleuses familiales SCA2 et SCA3 ont été aussi associés à des syndromes parkinsoniens héréditaires répondant à la levodopa (Wang JL *et al.*, 2009; Kim JM *et al.*, 2007).

Une association existe entre un syndrome parkinsonien et la Maladie de Gaucher de type I (OMIM 230800), la plus prévalente des maladies à accumulation de glycolipides, que dans le passé l'on distinguait des autres formes de M de Gaucher par l'absence d'atteinte neurologique (Neudorfer O *et al.*, 1996; Tayebi N *et al.*, 2001; Bembi B *et al.*, 2003). Il s'agit de cas d'un syndrome parkinsonien atypique avec âge de début de 40 à 60 ans qui ne répond pas à la thérapie (Varkonyi J *et al.*, 2003). En effet, les mutations du gène *GBA* peuvent représenter le facteur de risque le plus commun de développement de MP (Neumann J *et al.*, 2009) ; dans la seule population française il a été calculé que la présence de mutations du gène *GBA* augmente 5 fois le risque de développer MP (Lesage S *et al.*, 2011; Lesage S and Brice A, 2012).

Tableau 2: Liste des *loci* et des principales caractéristiques cliniques associés aux formes héréditaires de MP. Les *loci* associés aux formes monogéniques sont marqués en caractère gras (Trinh A and Farrer M, 2013; Kumar KR *et al.*, 2011; Martin I *et al.*, 2011).

| PARK Locus | Position | Gène | Transmission | Phénotype |
|--------------------|------------|-----------------|----------------|--|
| PARK1/PARK4 | 4q21 | <i>SNCA</i> | AD | MPF et démence |
| PARK2 | 6q25.2-q27 | <i>PARK2</i> | AR | MPF à début précoce |
| PARK3 | 2p13 | ? | AD | MPF à début tardif |
| PARK5 | 4p14 | <i>UCH-L1</i> | AD | MPF à début tardif |
| PARK6 | 1p35-p36 | <i>PINK1</i> | AR | MPF à début précoce |
| PARK7 | 1p36 | <i>DJ-1</i> | AR | MPF à début précoce |
| PARK8 | 12q12 | <i>LRRK2</i> | AD | MPF à début tardif |
| PARK9 | 1p36 | <i>ATP13A2</i> | AR | Syndrome Kufor–Rakeb (MPF à début précoce) |
| PARK10 | 1p32 | ? | ? | Phénotype pas définis |
| PARK11 | 2q36-q37 | <i>GIGYF2</i> | AD | MPF à début tardif |
| PARK12 | Xq | ? | Liée à l’X | Phénotype pas définis |
| PARK13 | 2p13 | <i>HTRA2</i> | AD | Phénotype pas définis |
| PARK14 | 22q13.1 | <i>PLA2G6</i> | AR | Parkinsonisme Plus |
| PARK15 | 22q12-q13 | <i>FBXO7</i> | AR | MPF à début précoce |
| PARK16 | 1q32 | <i>Vps35</i> | Susceptibilité | MPF à début tardif |
| PARK17 | 4p16 | <i>GAK</i> | Susceptibilité | MPF à début tardif |
| PARK18 | 3q27.1 | <i>EIF4G1</i> | AD | MPF à début tardif |
| FTDP-17 | 17q21.1 | <i>MAPT</i> | AD | Démence +/- parkinsonisme |
| SCA2 | 12q24.1 | <i>Ataxin 2</i> | AD | Ataxie. Rare parkinsonisme |
| SCA3 | 14q21 | <i>Ataxin 3</i> | AD | Ataxie. Rare parkinsonisme |
| Locus M. Gaucher | 1q21 | <i>GBA</i> | AD | Parkinsonisme tardif |
| | 6p21.3 | <i>HLA-DRA</i> | Susceptibilité | MPF à début tardif |

I.2.4.a Formes monogéniques dominantes

α-synucléine

Le gène *SNCA* (*PARK 1 et 4*), composé de six exons, code la protéine cytosolique α -synucléine, de 140 acides aminés.

La structure de la protéine comprend trois domaines : (1) la région N-terminale amphipathique (acides aminés 7-87), contenant sept répétitions imparfaites de 11 acides aminés, qui se chevauchent partiellement avec (2) le domaine hydrophobe central (acides aminés 61 à 95) ; (3) un domaine acide C-terminal, chargé négativement (acides aminés 96-140).

Trois différentes mutations faux-sens, toutes dans le domaine N-terminal ont été associées à des cas de MPF ; les substitutions A53T, la plus fréquente, A30P et E46K. Duplications et triplications du gène ont été également associées à des cas de MPF.

L' α -synucléine est la composante principale des corps de Lewy (Lewy's Bodies, LBs), qui se retrouvent disséminés dans les noyaux pigmentés du tronc encéphale, dans l'hippocampe et dans la région temporale du néo-cortex (Spillantini MG *et al.*, 1997; Spira PJ *et al.*, 2001).

LRRK2

LRRK2 (*PARK8*) est un grand gène composé de 51 exons codant la kinase à répétitions riches en Leucines 2, LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2), une protéine cytoplasmique de 2527 acides aminés. Les mutations du gène *LRRK2* sont responsables de la majorité des cas de MP familiales et sont aussi présentes dans les formes apparemment sporadiques (Healy DG *et al.*, 2008b; Lesage S *et al.*, 2007). Les formes associées aux mutations de ce gène peuvent présenter les caractéristiques pathologiques typiques avec LBs et plaques neurofibrillaires, ou présenter une pure dégénérescence de la substance noire (Wszolek ZK *et al.*, 2004).

La protéine LRRK2, de 285 kDa, appartient à la famille de protéines Roco (Ras of complex) (Bosgraaf L and Van Haastert PJ, 2003) et contient 12 répétitions riches en léucines (LRRs), un domaine GTPase typique du complexe des protéines Ras, un domaine C-terminale typique du Roc (COR, ou C-Terminal of Roc), un domaine

MAPKKK (pour Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase) et un domaine de répétitions WD40 (Paisan-Ruiz C *et al.*, 2004; Zimprich A *et al.*, 2004).

Sept mutations différentes de ce gène sont récurrentes, N1437H ; R1441C ; R1441G ; R1441H ; p.Y1699C, p.G2019S, p.I2020T. La mutation G2019S est la plus prévalente (40% des cas de MPF chez les patients de descendance Arabe (Lesage S *et al.*, 2005); 20% des patients Hébreux Ashkenazi, (Ozelius LJ *et al.*, 2006) et de 1% à 7% des patients MP Européens). La mutation R1441G est fréquente chez les populations Basques et la mutation I2020T chez les patients Japonais.

En ce qui concerne le rôle de LRKK2 et les mécanismes déterminants sa pathogénicité au cours de la MP, l'activité de sérine / thréonine-kinase réglée par le GTP est considérée de première importance : l'intégrité de cette activité est indispensable afin que la protéine mutée acquière une fonction toxique. Les variantes de LRRK2 décrites ont une activité kinase (et d'autophosphorylation) augmentée (Martin I *et al.*, 2011; Smith WW *et al.*, 2006).

I.2.4.b Formes monogéniques récessives

PARK2

Les mutations dans le gène *PARK2*, composé de 12 exons et codant la protéine Parkine de 465 acides aminés, sont associées à la majorité (environ 50%) des cas de MP à début précoce et à transmission autosomique récessive ; des mutations dans ce gène ont été associées à 77% des cas de MP sporadiques qui apparaissent avant l'âge de 20 ans, (Lucking CB *et al.*, 2000) et en général à 10%-20% des cas à début précoce (Klein C and Lohmann-Hedrich K, 2007).

Des mutations dans les 12 exons ont été observées, y compris des substitutions d'acides aminés, des petites délétions, des délétions d'exons et aussi des duplications. La mutation la plus fréquente est la délétion de l'exon 3.

Pathologiquement, la majorité des cas associés à des mutations de *PARK2*, présentent des phénomènes de perte neuronale et gliose, plus souvent en absence de LBs (Mori H *et al.*, 1998; Dawson TM and Dawson VL, 2010).

La protéine Parkine est une E3 ubiquitine-protéine ligase, par conséquent la dysfonction du système Ubiquitine Proteasome, UPS, est soupçonnée depuis longtemps être

impliquée dans la pathogénie de cette forme de MPF (voire section V: Mécanismes pathogéniques impliqués au cours de la MP).

PINK1 (PARK6)

Les mutations dans le gène *PINK1*, de huit exons, codant pour la protéine (pour PTEN Induced Kinase) sont, après celles du gène *PARK2*, les mutations le plus souvent associées aux cas de MPF précoce récessive, avec une fréquence variable de 1% à 9% avec des variations considérables entre les différents groupes ethniques (Klein C *et al.*, 2005). Les mutations observées sont des mutations nonsense ou faux-sens, plus rarement des délétions d'exons entiers. Plus souvent il s'agit de mutations nonsense localisées dans le domaine protéine kinase qui comportent la perte de la fonction de la protéine. Toutefois, la perte de fonction de la protéine n'a pas été observée pour toutes les mutations associées aux cas de MPF.

PINK1 est une protéine ubiquitaire qui consiste en 581 acides aminés ; sa structure comprend une séquence N-terminale - 34 acides aminés - qui fonctionne en signal d'adressage à la mitochondrie, un domaine conservé de sérine-thréonine kinase (acides aminés de 156 à 509), et un domaine autorégulateur C-terminal.

DJ1 (PARK7)

DJ1 est un gène de sept exons, codant pour une protéine de 189 acides aminés. Des mutations dans ce gène sont associées au cas récessifs de MPF, avec une basse fréquence. Il s'agit de substitutions de bases unitaires et de délétions exoniques.

La protéine *DJ1* est une petite (20 kDa) protéine ubiquitaire dont est reconnue la fonction de chaperon sensible aux niveaux de stress oxydant intracellulaire.

ATP 13A2 (PARK9)

ATP13A2 est un grand gène constitué de 29 exons codant pour une protéine de 1180 acides aminés. La protéine *ATP13A2* est constituée de 10 domaines transmembranaires et un domaine ATPase ; généralement elle se localise aux membranes des lysosomes.

Environ 10 différentes mutations, affectant directement ou indirectement les domaines transmembranaires, ont été associées à des cas récessifs de MPF. La plupart des

mutations produisent une protéine tronquée, instable, qui est retenue dans le réticulum endoplasmique et ensuite dégradée par le protéasome (Ramirez A *et al.*, 2006).

Les mutations dans le gène *ATP13A2* sont associées au syndrome de Kofur-Rakeb (Kofur-Rakeb Syndrome, KRS). Comme l'on a vu dans le paragraphe dédié à la description clinique de la maladie ; il s'agit d'un syndrome parkinsonien progressif, avec des signes pyramidaux et des troubles cognitifs.

II. Le système des ganglions de la base ; altérations neuropathologiques au cours des MH et MP

| | |
|--|-------|
| II.1 Les ganglions de la base, GBs ; anatomie et organisation fonctionnelle des circuits cortico-GB-thalamo-corticaux. | p. 40 |
| II.1.1 Anatomie descriptive des GBs | p. 41 |
| II.1.2 Organisation fonctionnelle de la boucle cortico-striato-pallido-thalamo-corticale | p. 43 |
| II.1.3 Systèmes dopaminergiques et autres connexions importants | p. 46 |
| II.2 Altérations neuropathologiques au cours des maladies MH et MP | p. 47 |
| II.2.1 Neuropathologie au cours de la MH | p. 47 |
| II.2.2 Altérations neuropathologiques au cours de la MP | p. 51 |

II.1 Les ganglions de la base, GBs ; anatomie et organisation fonctionnelle des circuits cortico-GB-thalamo-corticaux.

Au cours des maladies de Huntington, MH, et de Parkinson, MP, la dégénérescence atteint deux des structures constituant le système extrapyramidal des Ganglions de la Base, GBs, respectivement le striatum et la substance noire *pars compacta*, provoquant la dysfonction des boucles fonctionnelles dans lesquelles elles sont engagées.

Cette section est consacrée à la description anatomique et fonctionnelle de ce système.

Les ganglions de la base, GBs, sont un groupe de noyaux gris dits centraux, situés en profondeur dans le cerveau ; ils sont fortement interconnectés et organisés en plusieurs boucles cortico - sous-corticales.

Le système des GBs comprend : 1- le striatum, constitué par le noyau caudé et putamen, 2- le globus pallidum, GP, divisé en une partie externe, GPe, et une partie interne, Gpi, 3- le noyau sub-thalamique, STN, 4- la substance noire mésencéphalique divisée en *pars reticulata*, SNr, et *pars compacta*, SNc (Carpenter M, 1981).

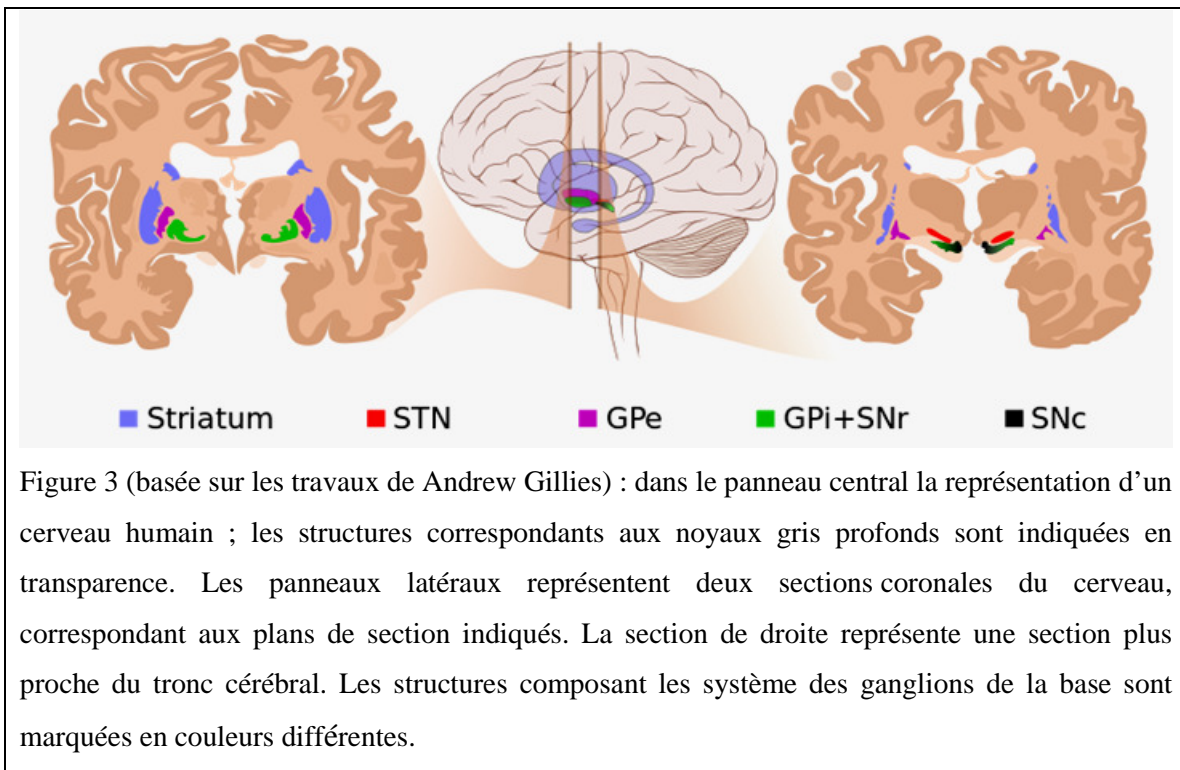


Figure 3 (basée sur les travaux de Andrew Gillies) : dans le panneau central la représentation d'un cerveau humain ; les structures correspondants aux noyaux gris profonds sont indiquées en transparence. Les panneaux latéraux représentent deux sections coronales du cerveau, correspondant aux plans de section indiqués. La section de droite représente une section plus proche du tronc cérébral. Les structures composant les système des ganglions de la base sont marquées en couleurs différentes.

Le système des ganglions de la base représente un des systèmes dédiés au contrôle de l'exécution des mouvements volontaires ; plusieurs évidences indiquent qu'ils ont aussi un rôle dans la planification, l'apprentissage et les émotions (pour revue Obeso JA *et al.*, 2008).

II.1.1 Anatomie descriptive des GBs

Le striatum

Le putamen et le noyau caudé partagent des caractéristiques anatomiques et cytologiques et sont incomplètement séparés par la capsule interne. La tête du noyau caudé et le putamen sont liés par des ponts de matière grise (*pontes grisei caudatolenticularis*).

Les deux noyaux constituent un composé homogène (Georgopoulos MDaA, 1981). Ils forment le striatum, qui représente la première étape d'intégration des circuits des GBs. Le nom de striatum provient de l'aspect strié de la capsule interne lorsqu'elle traverse ces noyaux.

Les neurones de projection du striatum, principalement GABAergiques (Smith Y *et al.*, 1987), sont caractérisés par un corps cellulaire de taille moyenne (10 à 20 μm de diamètre) dont émergent 3 à 5 branches dendritiques primaires recouvertes d'épines (DiFiglia M *et al.*, 1976). Ils sont pour cela appelés neurones épineux, MSNs (pour Medium Spiny Neurons). Différentes sous-populations de neurones épineux sont distinguables par leurs caractéristiques neurochimiques (Bolam JP *et al.*, 1983). Les interneurones non épineux sont une deuxième population neuronale striatale, divisée à son tour dans les sous-populations des neurones géants et neurones moyens, respectivement cholinergiques et GABAergiques.

Chez le chat et le primate le marquage histochimique pour l'acétylcholinestérase a révélé l'architecture du striatum, caractérisée par une compartimentation en striosomes et matrice (Graybiel AM and Ragsdale CW, 1978) ; ainsi chez les rongeurs a démontré la distribution hétérogène des récepteurs opioïdes μ (Herkenham M and Pert CB, 1981). Cette organisation reflète la distribution des différentes populations neuronales : les neurones épineux ont leurs corps cellulaires et leurs champs dendritiques dans les

striosomes ou dans la matrice. Les corps cellulaires des interneurons cholinergiques sont majoritairement localisés aux frontières des striosomes et de la matrice.

Le globus pallidus

Le globus pallidus, GP est une structure triangulaire située entre le putamen et le bras postérieur de la capsule interne. Il doit son nom de « corps pâle » aux nombreuses fibres myélinisées qui le traversent lui donnant un aspect plus clair par rapport aux autres noyaux. Il forme le noyau «lenticulaire ou lentiforme » en ensemble avec le putamen, qui doit son nom à la forme de lentille qui assume sur des coupes du cerveau.

Le GP est divisé en trois domaines fonctionnels : le globus pallidus interne, GPi, externe, GPe, et le pallidum ventral, PV, partie antérieure du GP située sous la commissure antérieure. Il est composé principalement de neurones GABAergiques (Carpenter M, 1981).

Le noyau subthalamique

Le lien fonctionnel existe entre le noyau subthalamique, NST - située entre la partie ventrale de la *zona incerta* et la partie dorsale des pédoncules cérébraux - et les GBs.

Le NST est aussi appelé corps de Luys du nom du chercheur qui l'a identifié en 1865. Les neurones du NST sont les seuls excitateurs glutamatergiques du système des GBs.

La substance noire

La substance noire, SN, représente le plus grand noyau mésencéphalique et est située dans le *tegmentum* ventral du mésencéphale. Les deux parties composant la SN sont distinguables par leur densité cellulaire : la *pars reticulata*, SNr, a une faible densité, au contraire de la *pars compacta*, SNc, qui présente une haute densité cellulaire.

Le nom de substance noire ou *locus niger* dérive de la pigmentation noire présentée, chez les primates, par les grands neurones dopaminergiques de la SNc. Les neurones dopaminergiques de la SN se projettent principalement sur le striatum. La SNr est constituée par des neurones GABAergiques qui se projettent surtout sur le thalamus, mais aussi sur des noyaux du tronc cérébral (*colliculus* supérieur, noyau pédonculopontique).

Le noyau accumbens

Le noyau accumbens reçoit des afférences en provenance de diverses structures limbiques (Alexander GE and Crutcher MD, 1990; Alexander GE *et al.*, 1990) ; ce noyau participe également à la boucle striato-pallido-thalamo-corticale. De fait il peut être considéré comme une interface entre le système limbique et le système moteur (Mogenson GJ *et al.*, 1980).

II.1.2 Organisation fonctionnelle de la boucle cortico-striato-pallido-thalamo-corticale (Fig. 4).

Les aires corticales motrices et somatosensitives primaires envoient des projections excitatrices glutamatergiques, organisées topographiquement, au striatum, principalement ipsilatéral.

Les neurones épineux moyens GABAérgiques (inhibiteurs) striataux envoient leurs projections efférentes aux GPi et GPe. Ces projections constituent deux voies qui se distinguent fonctionnellement : une voie directe et une voie indirecte. Les neurones de la voie directe, qui expriment les récepteurs D1 pour la dopamine, et coexpriment la substance P et la dynorphine, établissent des connections monosynaptiques avec les neurones du GPi/SNr. Il a été proposé que chaque région striatale innerve à la fois le GPi et la SNr (Alexander GE and Crutcher MD, 1990; Alexander GE *et al.*, 1990; Kawaguchi Y *et al.*, 1990). Les neurones de la voie indirecte, qui expriment les récepteurs D2 pour la dopamine, et coexpriment l'énképhaline, établissent des connections avec les neurones du GPe et indirectement, via le STN, du GPi/SNr.

La dopamine, le neurotransmetteur des neurones de la SNc, module les afférences glutamatergiques qui arrivent au striatum du cortex cérébral : spécifiquement, elle excite les neurones qui expriment les récepteurs D1 de la voie directe et inhibe les neurones qui expriment les récepteurs D2 de la voie indirecte (Gerfen CR *et al.*, 1990; Le Moine C and Bloch B, 1996; Le Moine C and Bloch B, 1995).

Le GPi représente la station de sortie des ganglions de la base. Il envoie des projections efférentes GABAérgiques au thalamus. Les neurones des différents noyaux thalamiques se projettent (projections glutamatergiques excitatrices) en retour vers le cortex frontal, refermant ainsi la boucle.

Donc, l'activation de la voie directe, enlevant l'action inhibitrice du GPi sur le thalamus, a un effet positif sur l'activité des aires motrices du cortex. Au contraire l'activation de la voie indirecte, détermine l'activation du segment STN-GPi et, par conséquent, l'inhibition de l'activité facilitatrice que le thalamus exerce sur les aires motrices du cortex.

Cette organisation correspond au modèle proposé par Albin en 1989 qui propose que l'apparition des troubles hyper- ou hypokinétiques est le résultat du déséquilibre entre les activités des voies directe et indirecte (Albin RL *et al.*, 1989; DeLong MR, 1990).

Par exemple, au cours de la pathogénie de la maladie de Parkinson, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée provoquerait l'hyperactivation des projections efférentes striatales vers le GPe et donc de la voie indirecte, normalement inhibée par la dopamine ; en même temps se produirait l'inhibition des projections vers GPi/SNr et de la voie directe, normalement activé par la dopamine (Albin RL *et al.*, 1989).

Cependant le modèle classique a été mis en cause par plusieurs évidences.

1- De projections excitatrices directes entre le cortex et le NST existent (Bevan MD and Bolam JP, 1995; Maurice N *et al.*, 1998; Nambu A *et al.*, 1996). Le NST représenterait une structure d'entrée excitatrice des GBs, en plus de la structure d'entrée inhibitrice striatale.

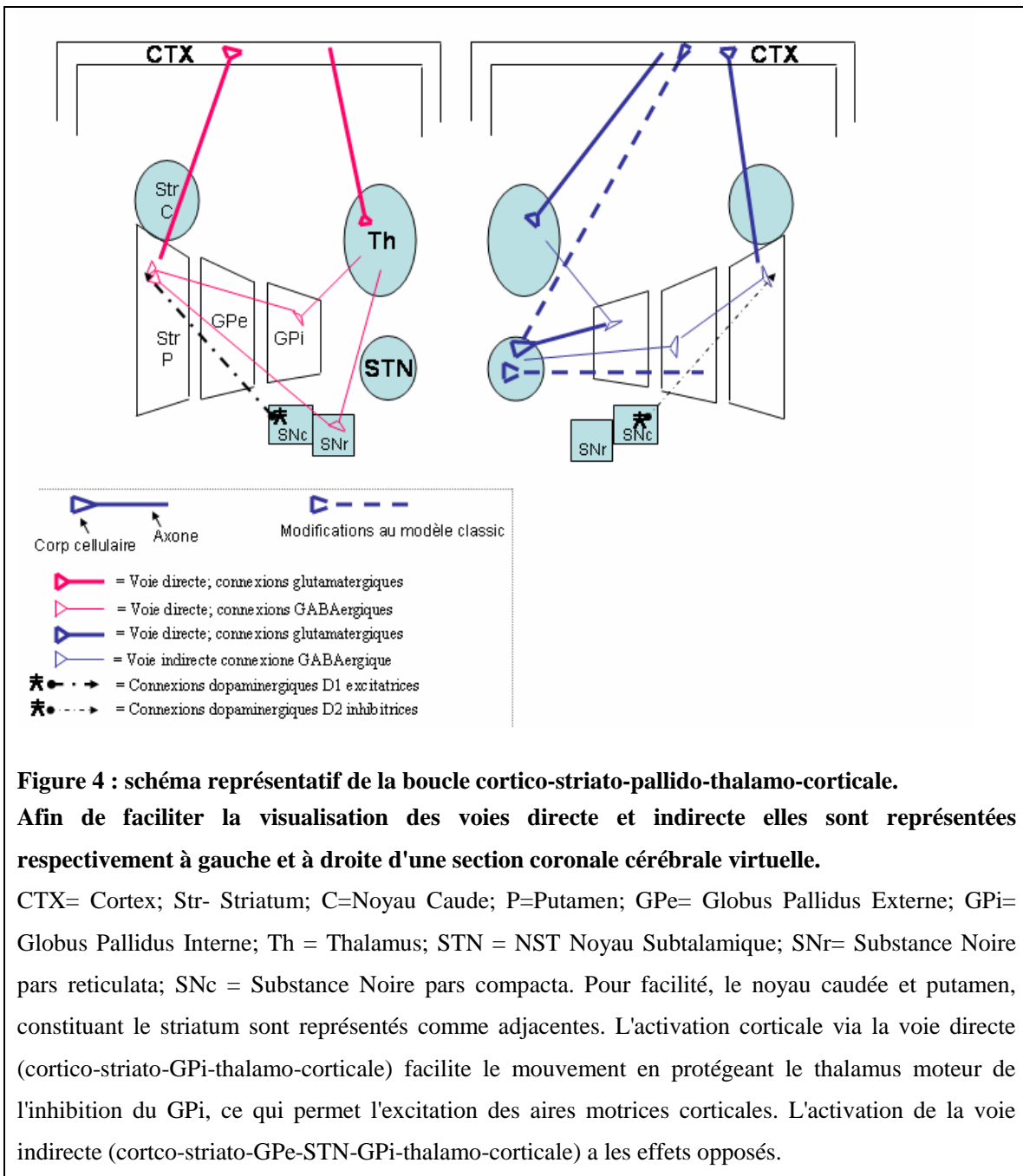
2- Certains neurones des GB possèdent de larges connectivités collatérales (Parent A *et al.*, 2000). Des projections directes pourraient aussi exister partant du GPe vers le thalamus. Le GPe serait donc une structure de sortie supplémentaire (Parent A and Hazrati N, 1995a; Parent A and Hazrati N, 1995b).

3- Les récepteurs D1 et D2 se retrouvent localisés ensemble dans certains neurones striataux (Aizman O *et al.*, 2000). Wu et ses collaborateurs ont suggéré que les neurones épineux moyens exprimant les récepteurs D1, classiquement associés à la voie directe, pourraient se projeter aussi sur le GPe (Wu Y *et al.*, 2000).

4- En réponse aux stimulations excitatrices en provenance du cortex, une sous-population des neurones du NST se projette vers le GPi et le GPe, en dépit de l'inhibition de ce dernier provoqué par l'activation de la voie indirecte (Rubchinsky LL *et al.*, 2003). De

plus, Rubchinsky propose la division des neurones pallidaux en sous-populations dont la stimulation symétrique de la part des sous-populations de GPe et GPi contribuerait à la fluidité de l'exécution du mouvement.

Tenant compte des modifications apportées au modèle classique, le GPe pourrait ainsi représenter une structure intégrative et non une simple structure relais de la voie indirecte.



II.1.3 Systèmes dopaminergiques et autres connexions importants

Systèmes dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques du mésencéphale comprennent : i) les neurones de la substance noire (SN), une des stations des ganglions de la base, qui se projettent sur le striatum, constituant la voie nigro-striée ; ii) les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV), à côté de la SN, qui constituent les fibres dopaminergiques ascendantes mésolimbiques et mésocorticales (connus pour jouer un rôle dans la mémoire, l'attention et la régulation des comportements additifs ou émotifs) ; iii) les neurones de l'aire rétro-rubrale (ARR) qui se projettent vers le striatum dorsal et la formation réticulée ; cette population de neurones est impliquée dans les mouvements orofaciaux. Les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée représentent un des systèmes sous-corticaux pour le contrôle du mouvement. A leur tour ils reçoivent des projections GABAergiques inhibitrices du striatum et glutamatergiques excitatrices du NST (Björklund A and Lindvall O, 1984).

Projections thalamo-striatales

Les projections thalamiques excitatrices vers le striatum ont leur origine majoritairement dans les noyaux intralaminaires du thalamus (Cowan WM and Powell TM, 1956; Powell TP and Cowan WM, 1954).

Autres projections au striatum

Le striatum reçoit projections provenant majoritairement de la substance noire et du thalamus ; mineurairement afférences striatales proviennent de i) l'amygdale, une structure du système limbique qui envoie des projections excitatrices (Noda K, 1968); ii) le noyau dorsal du *raphé*, d'où naissent des projections inhibitrices sérotoninergiques vers le pallidus, la SN et le striatum (Szabo J, 1970; Halliday G *et al.*, 1995)

II.2 Altérations neuropathologiques au cours des maladies MH et MP

II.2.1 Neuropathologie au cours de la MH

En général les cerveaux des patients atteints de MH présentent une perte de 30% du poids, en comparaison avec les cerveaux de sujets contrôle. Cette perte est la conséquence de l'atrophie progressive du striatum, observée chez 95% des patients. L'atrophie du noyau caudé est associée à la perte neuronale et à l'atrophie progressive des autres régions cérébrales, ainsi l'atrophie des lobes frontaux est observée chez 80% des patients. L'atteinte des différentes régions reflète la progression temporelle de la pathologie, concernant davantage la queue du noyau caudé que la tête (revu dans Bonilla E, 2000).

Le niveau d'atrophie du striatum analysé *post-mortem* est corrélé avec le niveau de gravité de la maladie (Vonsattel JP *et al.*, 1985; Myers RH *et al.*, 1988). Une échelle d'évaluation a été définie par Vonsattel et ses collaborateurs (Vonsattel JP *et al.*, 1985) : 5 cadres neuropathologiques sont définis comme grades progressifs de 0 à 4, correspondant aux respectifs stades évolutifs de la MH. Le grade 0 est défini par l'apparition des premiers symptômes en absence d'anomalies neuropathologiques. Dans le grade 1, le noyau caudé a perdu la moitié des neurones et présente les caractéristiques de l'astroglie. Dans le grade 2, le noyau caudé est atrophié. Le grade 3 correspond à la perte de la moitié de l'épaisseur de la capsule interne et à la perte neuronale massive dans le putamen. L'atrophie et la forte astroglie du putamen sont caractéristiques du grade 4.

La neurodégénérescence au cours de la MH est très sélective et surtout dans les stades pre-symptomatiques et précoces de la maladie elle affecte préférentiellement les neurones MSNs GABAergiques et enképhalinerigiques striataux se projetant à la SN et au GPe (Graveland GA *et al.*, 1985; Hedreen JC and Folstein SE, 1995; Deng YP *et al.*, 2004; Ferrante RJ *et al.*, 1985; Brouillet E *et al.*, 1999; Vonsattel JP and DiFiglia M, 1998; Richfield EK *et al.*, 1995). La perte des projections sur le globus pallidus externe de la voie indirecte comporte la perte des afférences inhibitrices au thalamus et contribue à l'augmentation des mouvements involontaires (Richfield EK *et al.*, 1995; Albin RL *et al.*, 1989).

Dans les phases initiales les MSNs présentent une augmentation du nombre de connexions de leurs épines dendritiques, ainsi que des segments recourbés anormaux au niveau distal. A cela fait suite une phase dégénérative où les neurones perdent leurs épines au niveau proximal et le nombre de segments recourbés est accru. Ce comportement biphasique des altérations neuronales a été aussi observé au cours de la Maladie d'Alzheimer et est probablement corrélé avec les troubles cognitifs (Graveland GA *et al.*, 1985; Ferrante RJ *et al.*, 1991).

Cette dégénérescence se traduit par la perte de marqueurs striataux (DARPP-32, CALB 28K) (Ferrante RJ *et al.*, 1991).

Les neurones non épineux de taille moyenne (calrétinine), les larges cholinergiques et ceux contenant la synthétase de l'oxyde nitrique, les interneurons NADPH diaphorase et somatostatine-positifs ainsi que les populations afférentes provenant d'autres régions du cerveau sont relativement épargnés (Ferrante RJ *et al.*, 1985; Ferrante RJ *et al.*, 1987; Cicchetti F *et al.*, 1996).

La dégénérescence porte à l'atrophie des régions atteintes ; dans les derniers stades de la MH au niveau striatal l'atrophie atteint 60%. Un large éventail de régions du cerveau présente niveaux limites d'atrophie (20-30%) ; ces régions sont le GP, le thalamus, le STN, la SN, l'amygdale, l'hippocampe, la protubérance et le bulbe rachidien, la moelle épinière, l'olive supérieure, le cloître ; l'extension de la pathologie au cervelet a été mise en discussion (de la Monte SM *et al.*, 1988; Vonsattel JP *et al.*, 1985; revu dans Vonsattel JP and DiFiglia M, 1998).

La perte neuronale atteint 95% des neurones dans le striatum des patients MH dans les stades avancés, la densité neuronale est donc fort réduite à ce niveau. En revanche, dans les autres régions du cerveau les niveaux d'atrophie correspondent à la perte neuronale (revu dans Vonsattel JP and DiFiglia M, 1998) et ne déterminent pas de changements de la densité neuronale. Une exception est représenté par le globus pallidus, où la dégénérescence est sélective pour les fibres de passage, et on assiste à l'augmentation de la densité neuronale (Vonsattel JP *et al.*, 1985).

La dégénérescence atteint tardivement le cortex cérébral, la substance blanche sous corticale et le thalamus (Petersen A *et al.*, 1999). Au niveau cortical la perte implique les

populations des neurones pyramidaux des couches III, V et VI, y compris ceux projetant directement au striatum (Cudkowicz M and Kowall NW, 1990; Hedreen JC *et al.*, 1991; Heinsen H *et al.*, 1994; Sotrel A *et al.*, 1991).

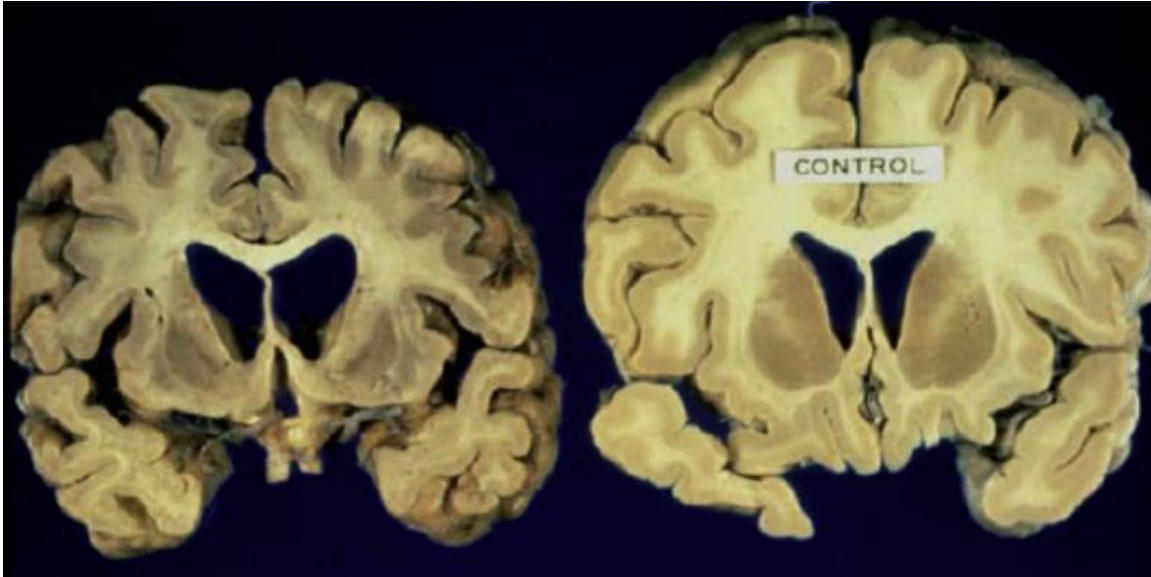


Figure 5 : aspect macroscopique d'un cerveau d'un patient atteint de maladie de Huntington (à gauche) en stade avancé, où est visible l'atrophie corticale et sous-corticale marquée, en comparaison avec un cerveau contrôle.

La formation des inclusions contenant la HTT mutée est une caractéristique distinctive de la MH et précède l'apparition des symptômes. Les inclusions se localisent au niveau des noyaux, du cytoplasme ainsi que des prolongements des neurones. Des approfondissements sur les mécanismes impliqués dans leur formation ainsi que sur le rôle qu'ils jouent dans la pathogénie de la MH sont inclus dans la section IV : mécanismes pathogéniques au cours de la MH.

Etudes *in vivo* : neuroimagerie fonctionnelle

Le développement de la tomographie par émission de positrons (PET) a permis d'effectuer des mesures *in vivo* de certains aspects de la fonction cérébrale régionale. Le métabolisme cérébral régional du glucose peut être facilement quantifié avec le [18F] fluoro-2-désoxyglucose (FDG) ; la fonction dopaminergique pré-synaptique peut être étudiée par l'utilisation de l'analogue radiomarquée de la dopamine le 6 [18F] fluoro-L-dopa, la fonction dopaminergique post-synaptique, par les ligands des récepteurs la dopamine, par exemple l'[11C] 8-Chloro-2,3,4,5- tetrahydro-3-[11C]methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepin-7-ol ou [11C] SCH 23390 (récepteurs D1) et la [11C] raclopride (RACLO) (récepteurs D2).

Il a été démontré par des études de ce type qu'au niveau striatal l'hypométabolisme du glucose précède le développement de l'atrophie et la manifestation clinique de la MH. La diminution du métabolisme du glucose au niveau du noyau caudé peut aussi se retrouver dans certaines sujets à risque pour la MH (porteurs d'un allèle avec une expansion de taille intermédiaire) (Kuhl DE *et al.*, 1982; Hayden MR *et al.*, 1986; Antonini A *et al.*, 1996; Martin WR ad Hayden MR, 1987; Feigin A *et al.*, 2001).

En ce qui concerne le métabolisme de la dopamine, tous les patients atteints de MH et une proportion de porteurs asymptomatiques de la mutation montrent une fonctionnalité des récepteurs striataux D1 et D2 significativement réduite (Andrews TC *et al.*, 1999; Antonini A *et al.*, 1996; Leenders KL *et al.*, 1986; Hagglund J *et al.*, 1987; Brandt J *et al.*, 1990; Sedvall G *et al.*, 1994; Turjanski N *et al.*, 1995; Weeks RA *et al.*, 1996; Ginovart N *et al.*, 1997).

II.2.2 Altérations neuropathologiques au cours de la MP

Le processus de neurodégénérescence observé au cours de la MP prévaut dans les neurones dopaminergiques de la SNc avec une conséquente grave diminution des taux de dopamine dans le striatum. A l'intérieur de la SNc la perte neuronale n'est pas homogène, affectant majoritairement le secteur ventral latéral suivi par le secteur ventral médial et le secteur dorsal (Dauer W and Przedborski S, 2003; Fearnley JM and Lees AJ, 1991).

Selon la distribution des projections striatales provenant de ces zones, la perte de la neuro-transmission dopaminergique affecte le plus souvent le secteur dorso-latéral et les secteurs intermédiaires du putamen (Kish SJ *et al.*, 1988; Agid Y *et al.*, 1993; Dauer W and Przedborski S, 2003) produisant l'akinésie et la rigidité. La perte de ces neurones riches en neuromélanine produit l'aspect typiquement dépigmenté de la SNc observé dans les échantillons *post mortem* des patients MP.

Faits intéressants: 1) la perte des neurones dopaminergiques est corrélée à la diminution de l'ARN messager et de l'expression du transporteur de la dopamine (Dopamine Transporter, DAT) (Uhl GR *et al.*, 1994) ; 2) les neurones dopaminergiques autres que ceux de la voie nigro-striée, comme les neurones de la voie meso-limbique-meso-corticale provenant de l'aire tegmentale ventrale, présentent des niveaux de dégénérescence notamment inférieurs (Uhl GR *et al.*, 1985).

La distribution de la dégénérescence intéresse de façon variable d'autres régions ; les manifestations cliniques alors varient de manière concordante.

Les troubles cognitifs plus marqués se manifestent lorsque i) la partie médiale de la SNc, et les projections au noyau caudé, ii) les structures corticales (surtout le cortex enthorinale) ou iii) sous-corticales (noyau de Meynert; locus cæruleus) sont atteintes.

Les troubles du comportement, y compris la dépression, se manifestent à cause de la compromission de la neurotransmission noradrénergique (*locus cæruleus*) et serotoninergique (noyau du *raphé*).

L'anosmie se présente lorsque le bulbe olfactif est atteint ; les dysfonctions du système autonome ont lieu lorsque les colonnes intermedio-latérales de la moelle épinière, les ganglions sympathétiques et para-sympathétiques ou le noyau amygdalien central sont atteints (Gibb WR and Lees AJ, 1991; revu dans Wolters E, 2008; Braak H *et al.*, 1994;

Tandberg E et al., 1996; Agid *et al.*, 1990; Hirsch EC *et al.*, 1987; Jellinger K, 1988; Mann DM *et al.*, 1983).

Etudes *in vivo* : neuroimagerie fonctionnelle

Les études de PET chez les patients atteints de la MP, ont aussi révélé que la diminution de l'absorption 18F-fluorodopa au niveau du système des GBs est proportionnelle au degré de bradykinésie (Lozza C *et al.*, 2002). La dysfonction des neurones dopaminergiques se reflète sur l'activité du cortex moteur : il a été démontré chez les rats que l'administration de halopéridol, un médicament anti-dopaminergique, provoque l'apparition d'une bradykinésie suivie de la diminution de l'excitation des neurones corticaux (Parr-Brownlie LC and Hyland BI, 2005).

Les stigmates histopathologiques de la MP : les corps et les neurites de Lewy

Les corps de Lewy (Lewy Bodies, LBs) sont des inclusions hyalines éosinophiles systématiquement observées dans les populations neuronales atteintes au cours de la MP ; principalement dans les neurones survivants de la SNc (Tretiakoff C, 1919) mais aussi dans d'autres structures comme le *locus caeruleus* et le cortex (Agid Y *et al.*, 1993; Forno LS, 1987). Ils mesurent habituellement plus de 15 μm de diamètre et ont souvent un aspect targétoïd : un centre sphérique dense et granulaire est entouré d'un halo périphérique clair et hyalin (Fig. 5).

Les LBs contiennent une variété de constituants, qui peuvent être divisés en quatre catégories : i) des éléments structurels, y compris la composante majeure α -synucléine (Spillantini MG *et al.*, 1997), ii) des protéines qui représentent une réponse cellulaire à la formation des corps de Lewy, iii) des enzymes (phosphatases et kinases), iv) d'autres protéines cytosoliques probablement piégées dans les LBs au cours de leur formation.

L'ubiquitine, les neurofilaments la protéine UCH-L1, des sous-unités du protéasome, l'inhibiteur phosphorylé de NF-kB ($\text{IkB}\alpha$) ; et encore la Parkine et ses substrats, comme p38; PAEL R et la synphiline ont été retrouvés par marquage spécifique dans les LBs (pour une revue Rankin CA *et al.*, 2011). La présence de sphingomyeline outre que de protéines a aussi été démontrée (den Jager WA, 1969). La présence dans les LBs des sous-unités des neurofilaments indique que la structure des axones est critiquement

altérée, ce qui est soupçonné conduire éventuellement à des phénomènes de 'dying-back' (Trojanowski JQ and Lee VM, 1994).

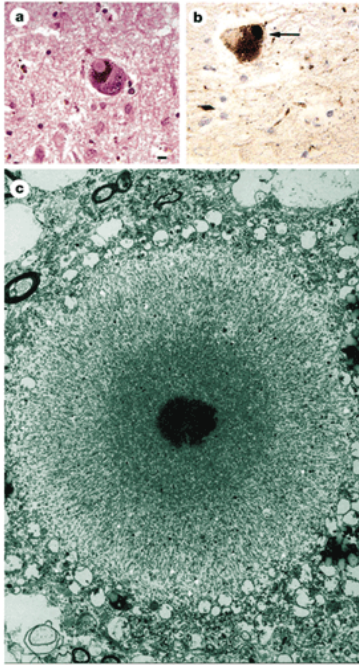


Figure 6. (d'après Beal 2001). **Les corps de Lewy (LBs), les stigmates histopathologiques de la MP** : les LBs sont des inclusions cytoplasmiques qui peuvent être immunomarquées par l'éosine-hématoxyline (a) ou par des anticorps contre l' α -synucléine (b). En microscopie électronique les LBs apparaissent avec un centre dense, contenant des protéines ubiquitylées, entouré d'un halo plus clair, constitué en partie de filaments d' α -synucléine et de neurofilaments (c).

On parle de néurites de Lewy, LNs, lorsque la dégénérescence rend les néurites positifs au marquage pour l'ubiquitine et l' α -synucléine. Ils peuvent être observés dans toutes les régions atteintes du tronc cérébrale (Gai WP *et al.*, 1995).

Comme pour la MH la discussion des mécanismes impliqués dans la formation des inclusions ainsi que le rôle qu'ils jouent dans la pathogénie de la MP sont traités dans la section V : Mécanismes pathogéniques au cours de la MP.

La présence des LBs est considérée un critère indispensable pour le diagnostic de la MP, mai non spécifique : les LBs peuvent être repérés aussi dans un petit nombre d'autres maladies neurodégénératives comme la Maladie d'Alzheimer, la maladie à corps de Lewy, les syndromes parkinsoniens post-encéphaliques et au cours du vieillissement normal (Jellinger K, 1987) ; leur présence pourrait aussi indiquer un stade pré-symptomatique de la MP (Fearnley JM and Lees AJ, 1991; Forno LS, 1987), des mécanismes compensatoires pouvant masquer les signes cliniques à ce stade (Anglade P *et al.*, 1995). Leur présence peut également représenter une réaction à la séquestration neuronale des protéines toxiques. Dans ce cas leur formation pourrait être considérée comme un mécanisme de neuroprotection (McNaught KS *et al.*, 2001)

III. Mécanismes pathogéniques communs aux maladies neurodégénératives

| | | |
|-----------|---|-------|
| III.1 | Définition des maladies neurodégénératives | p. 55 |
| III.2. | Le stress oxydant | p. 56 |
| III.2.1 | Production des EROs et des ERAs | p. 56 |
| III.2.2 | Les systèmes antioxydants | p. 58 |
| III.2.3 | Dégâts cellulaires produits par le stress oxydant | p. 58 |
| III.2.4 | Le stress oxydant au cours des MH et MP | p. 59 |
| III.3 | Hyperactivation des systèmes de neurotransmission | p. 61 |
| III.3.1 | Excitotoxicité glutamatergique | p. 61 |
| III.3.2 | L'excitotoxicité au cours des maladies MH et MP | p. 64 |
| III.3.2.a | L'excitotoxicité au cours de la MH | p. 64 |
| III.3.2.b | L'excitotoxicité au cours de la MP | p. 65 |
| III.3.3 | Toxicité dopaminergique au cours de la MH | p. 66 |
| III.3.4 | Autres mécanismes modulateurs de l'excitotoxicité | p. 67 |
| III.4 | La neuroinflammation | p. 70 |
| III.4.1 | Le processus neuroinflammatoire | p. 70 |
| III.4.2 | Evidences de neuroinflammation au cours des maladies MP et MH | p. 71 |

III.1 Définition des maladies neurodégénératives

La MH et la MP sont des maladies neurodégénératives, maladies dont l'étiologie est pour la plus grand part inconnue.

Ces maladies ont des manifestations cliniques diversifiées comprenant, entre autres, les maladies des neurones moteurs telles que la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), les troubles cérébelleux, la Maladie de Huntington (MH), la Maladie de Parkinson (MP), la Maladie d'Alzheimer (MA). Des aspects du processus de neurodégénérescence ont été décrits pour la schizophrénie (Archer T, 2010; Pasternak O, *et al.*, 2012). Ces maladies sont des maladies orphelines, c'est-à-dire des pathologies ne bénéficiant pas de traitement efficace.

La dégénérescence atteint une population neuronale de façon relativement sélective : dans les cas de la MH elle concerne les neurones épineux de taille moyenne du striatum, dans la MP les neurones dopaminergiques la substance noire du mésencéphale. Elle est aussi progressive et conduit inévitablement à la mort neuronale. Il est aujourd'hui reconnu qu'au cours de la progression de ces pathologies les autres populations de neurones peuvent être secondairement atteintes, et que la diffusion du processus neurodégénératif peut suivre les circuits de communication intracérébrale. Récemment différentes études ont observé des similarités entre le mode de progression du processus neurodégénératif dans ces maladies avec celui observé dans les maladies à prions (revu dans Luk KC *et al.*, 2009; Mallucci G, 2013).

Les études épidémiologiques et expérimentales ont fourni les preuves que plusieurs facteurs de risque tels que l'âge avancée, les anomalies génétiques et un nombre de mécanismes pathogéniques, tels que des anomalies du cytosquelette, l'auto-immunité, les carences en minéraux, certaines troubles métaboliques, l'hypertension et d'autres troubles vasculaires contribuent à la dégénérescence des neurones. Mais les mécanismes les plus universellement reconnus comme ayant un lien étroit avec la neurodégénérescence sont : 1) le stress oxydant, 2) la persistance de quantités élevées des neurotransmetteurs excitateurs au niveau de la synapse, l'excitotoxicité, et 3) la neuroinflammation.

Cette section comprend des approfondissements sur ces mécanismes.

III.2 Le stress oxydant

Le terme stress oxydant indique une perturbation de l'état oxydant intracellulaire, induite soit par une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les espèces réactives de l'azote (ERA), soit par une diminution de la capacité des défenses antioxydantes de l'organisme. Dans la définition de stress oxydant est donc comprise celle de stress nitrosatif.

Pouvant être à la fois la cause ou une des causes et la conséquence de la dégénérescence, le rôle de premier plan du stress oxydant au cours de la pathogénie des maladies neurodégénératives a été reconnu depuis longtemps.

III.2.1 Production des EROs et de ERAs

Les EROs dérivent de la réduction partielle et incomplète de l'oxygène moléculaire. La molécule d'oxygène peut accepter jusqu'à quatre électrons. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) - plus stable et capable de diffuser librement dans la cellule-, le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et l'eau (H_2O) correspondent aux formes réduites de l'oxygène respectivement par 1, 2, 3 ou 4 électrons.

L' $O_2^{\bullet-}$ peut être généré par des enzymes tels que les NADPH oxydases (Babior BM, 1999; Vignais PV, 2002), les oxygénases dépendantes du cytochrome P450 dans les réticulum endoplasmique (Morel Y *et al.*, 1999; Coon MJ, 2002) et la xanthine oxydase (Yokoyama Y *et al.*, 1990).

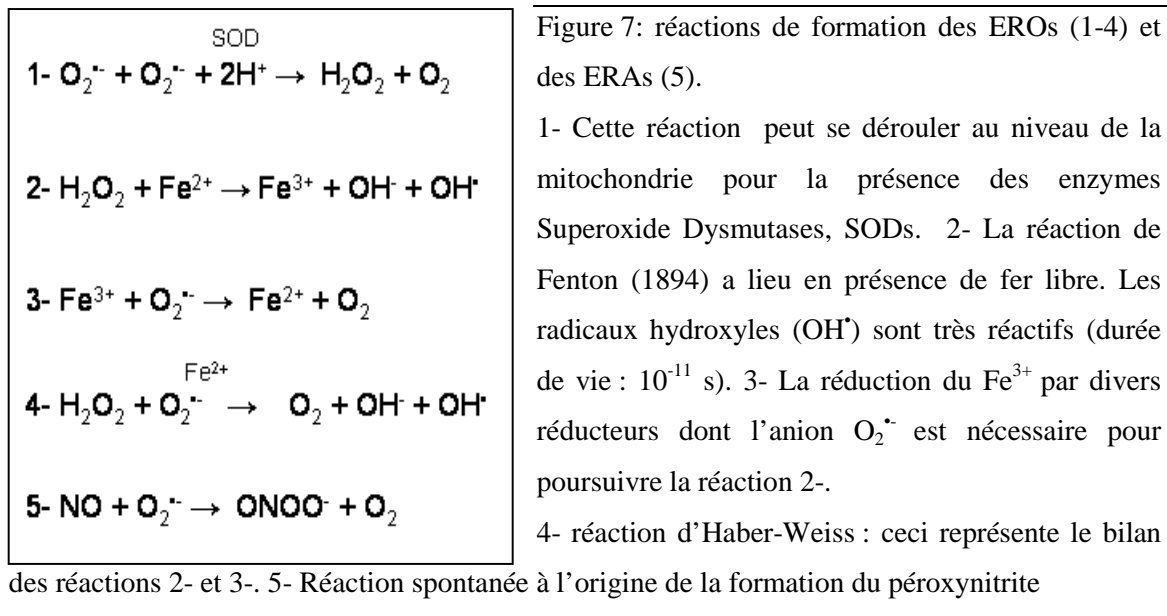
La production non enzymatique de $O_2^{\bullet-}$ a lieu lorsque les électrons, provenant par exemple des coenzymes réduits ou de groupes prosthétiques (flavines ou groupes fer-soufre), peuvent réagir directement avec l'oxygène.

L'oxyde nitrique (NO), source des ERAs, est produit dans les cellules par l'action d'un groupe d'enzymes appelés synthétases de l'oxyde nitrique (Notric Oxyde Synthases, NOS), qui existent en plusieurs isoformes : neuronale, nNOS, inducible iNOS, endothéliale eNOS et mitochondriale, mtNOS, localisée à la membrane mitochondriale interne, constitutivement exprimée (Ghafourifar P and Richter C, 1997).

Le NO réagit spontanément avec l' $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxyde nitrique, $ONOO^-$ (Fig. 6). L' $ONOO^-$ se combine avec les macromolécules (Drew B and Leeuwenburgh C, 2002)

altérant leur fonction. En outre, même étant peu réactif, il forme toutefois d'autres intermédiaires réactifs comme le nitrite, NO^{2-} , et le nitrate, NO^{3-} .

Le NO est très important dans la régulation de la fonction mitochondriale, particulièrement de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, par inhibition de la cytochrome c oxydase (COX ou Complexe IV) et de la biogenèse mitochondriale. (Giulivi C, 1998 and 2007; Nisoli E and Carruba MO 2006).



Les métaux de transition (fer, cuivre, cobalt, aluminium, manganèse) catalysent efficacement la réaction d'Haber-Weiss. Cependant, dans l'organisme, le fer se trouve généralement complexé sous forme Fe^{3+} à des éléments protéiques tels que la ferritine ou la lactoferrine ; dans ces conditions physiologiques le fer complexé ne provoque pas la formation de OH^{\bullet} et n'effectue pas de peroxydation.

La réaction d'Haber-Weiss peut aussi se produire dans les neurones dopaminergiques car la dégradation enzymatique de la dopamine produit de l' H_2O_2 .

III.2.2 Les systèmes antioxydants

Dans la cellule plusieurs enzymes neutralisent les radicaux libres : les Superoxyde Dismutases (SODs, cytosolique et mitochondriale), la Catalase (Cat, peroxydomale) et les Glutathione Peroxydases (Gpx, intracellulaire, cytosolique et extracellulaire) (Fig. 8).

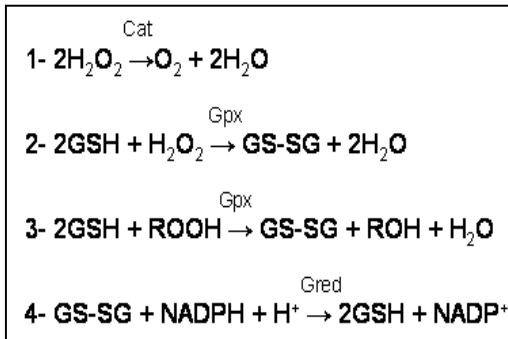


Figure 8 : réactions catalysées par les enzymes antioxydants. Outre la réaction 1- de la figure précedente, catalysée par la SOD, les réactions indiqu es ont lieu dans la cellule afin de neutraliser les EROs. Les enzymes Catalase (Cat) et Glutathione Peroxydase (Gpx) travaillent en partenariat avec la SOD. La Gpx utilise le

Glutathion (g-glutamine-cyst einylicine), un tripeptide, qui dans sa forme réduite GSH est un anti-oxydant endogène pour réduire l'H₂O₂ (réaction 2) ou les molécules oxydées (ROOH et ROH) (réaction 3). A son tour le GS-SG produit par l'action de la Gpx, doit être réduit à GSH par la Glutathion réductase (Gred), qui utilise le NADPH comme cofacteur.

III.2.3 Dégâts cellulaires produits par le stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides) et des lésions secondaires au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites lib r es.

Oxydation des lipides

L'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des membranes génère des péroxydes lipidiques, très réactifs (Hulbert AJ, 2005) qui modifient la fluidité, la perméabilité et l'excitabilité des membranes (Hong JH *et al.*, 2004). La p roxydation de lipides fournit également des intermédiaires qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett LJ, 1999).

Les produits formés lors de la p roxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS), le 4-hydroxynonenal (4-HNE) et l'accumulation de lipofuscine sont étudiés comme marqueurs de la p roxydation lipidique.

Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines consiste dans l'introduction d'un groupe carbonyle dans la structure et par conséquent détermine la modification de la structure de la chaîne protéique, la perte de fonction catalytique ou l'augmentation de la sensibilité aux protéases (Requena JR *et al.*, 2003).

Oxydation des acides nucléiques

Des taux élevés de radicaux libres peuvent endommager la structure de l'ADN provoquant des coupures en brins et des mutations spontanées (Bruchelt G *et al.*, 1991). L'augmentation des taux de 8-hydroxyguanosine, 8OHG, produite par une modification du carbone 8 de la guanine, empêche la transcription et la réplication de l'ADN et est considérée comme un marqueur du stress oxydant. L'oxydation de l'ADN affecte à la fois le noyau et la mitochondrie, qui contiennent leur propre ADN.

III.2.4 Le stress oxydant au cours des MH et MP

Des études post-mortem sur les cerveaux des patients ont impliqué le rôle du stress oxydant dans la pathogénie des MP et MH. Toutefois il n'est toujours pas clair si l'accumulation de ROS est un événement primaire ou une conséquence d'autres dysfonctionnements cellulaires.

Stress oxydant et MH. Les marqueurs de l'oxydation des lipides, protéines et acides nucléiques sont augmentés chez les patients MH. L'accumulation de lipofuscine, vu par marquage histochimiques sur les échantillons *post-mortem* de striatum et de cortex des patients MH, ainsi que les dosages biochimiques de malondialdéhyde (MDA) et 4-hydroxynonéal (HNE) et les taux de 3-nitrotyrosine sont significativement élevés chez les patients MH (Browne SE *et al.*, 1999; Stoy N *et al.*, 2005; Sorolla MA *et al.*, 2008). L'augmentation marquée des niveaux de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8 OHdG) a été constatée dans le plasma et l'urine de patients MH (Chen CM *et al.*, 2007). Ces paramètres peuvent donc être mesurés *in vivo* comme marqueurs pour suivre l'évolution de la maladie.

Stress oxydant et MP. Les études conduites *post-mortem* sur les cerveaux des patients MP ont révélé l'augmentation des taux de peroxydation des lipides et de l'oxydation de protéines et d'ADN au niveau de la SN (Dexter DT *et al.*, 1989; Zhang J *et al.*, 1999).

Au cours de la MP le défaut sélectif du complexe I, documenté sur les échantillons *post-mortem* et sur les tissus périphériques des patients atteints de MP, pourrait engendrer une excessive de production de EROs (Parker WD *et al.*, 2008; Schapira AH *et al.*, 1989 and 1990; Mizuno Y *et al.*, 1989).

Mais l'observation que d'autres facteurs peuvent être altérés en différentes combinaisons, comme le contenu de dopamine et des produits de son métabolisme, la diminution de GSH, un contenu élevé en fer au niveau de la SN a été à l'origine de l'« hypothèse des radicaux libres » (Jenner P *et al.*, 2003) formulée pour expliquer la mort neuronale dans la MP.

La dopamine est chimiquement instable et subit une auto-oxydation pour former les quinones de la dopamine (DAQS) et $O_2^{\cdot-}$. Cette réaction est catalysée par la présence de métaux, de l'oxygène, et des enzymes tels que la tyrosinase. L'auto-oxydation de la dopamine peut être augmentée dans les premiers stades de la maladie lorsque la neurotransmission dopaminergique est augmentée pour compenser la mort de neurones dopaminergiques (Scherman D *et al.*, 1989). D'autres métabolites de la dopamine tels que l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC), peuvent subir une oxydation à deux électrons engendrant en même temps EROs et DOPAC-quinones (Gluck MR and Zeevalk GD, 2004). La baisse des niveaux de GSH à son tour contribue à l'augmentation des DOPAC-quinones, à l'inhibition de l'activité du Complexe I et de l'activité de l'enzyme Gred, instaurant un mécanisme de cercle vicieux (revu dans Chinta SK and Andersen JK, 2008).

III.3. Hyperactivation des systèmes de neurotransmission

Une partie des phénomènes de toxicité neuronale observés au cours de la MH dans le striatum (mais aussi dans le cortex préfrontal) et de la MP dans la substance noire sont explicables comme conséquences de l'hyperactivité des systèmes de neurotransmission glutamatergiques et dopaminergiques : on parle alors de phénomènes liés à l'excitotoxicité.

III.3.1 Excitotoxicité glutamatergique

Des projections glutamatergiques corticostriatales s'étendent à partir de neurones corticaux dans des couches III, V VI à toutes les régions striatales (Gerfen CR and Engber TM, 1992; Graybiel AM *et al.*, 1994). Au cours de la MH, celles-ci seraient hyperactives en conséquence de la dégénérescence des MSNs GABAergiques striataux et à l'activation de la neurotransmission dopaminergique de la voie directe.

Au cours de la MP, les afférences glutamatergiques qui arrivent à la SNc du STN deviennent hyperactives, engendrant des phénomènes de excitotoxicité.

Les phénomènes de excitotoxicité glutamatergique sont étroitement liés à la dérégulation du calcium, Ca^{2+} , intracellulaire ; la dérégulation calcique entraîne une chaîne des réactions intracellulaires et la mort neuronale. L'excitotoxicité peut être directe si elle est causée par l'augmentation extracellulaire de glutamate, ou indirecte lorsque l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est secondaire à un dysfonctionnement métabolique ou énergétique (pour une revue Greene JG and Greenamyre JY, 1995 and 1996).

Le glutamate exerce son action via différents types de récepteurs (Fig. 9), les récepteurs métabotropiques et les récepteurs ionotropiques. Les premiers sont couplés via les protéines G et les messagers secondaires aux systèmes de transfert des signaux à l'espace intracellulaire (Hollmann M and Heinemann S, 1994). En ce qui concerne les deuxièmes, il s'agit de canaux cationiques dépendant des ligands. Les récepteurs ionotropiques sont

distingués en récepteurs N-méthyl-Daspartate, NMDA, et récepteurs non NMDA : AMPA (amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazolepropionate) et KA (kainate).

L'activation des récepteurs non NMDA permet la sortie du potassium de la cellule et l'entrée du sodium engendrant la dépolarisation de la membrane post-synaptique.

Lorsque la dépolarisation est importante, l'extrusion du magnésium, qui normalement bloque les récepteurs NMDA, permet l'activation de ces derniers et, par conséquent, l'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule.

A la membrane postsynaptique les récepteurs NMDA sont regroupés au niveau de la densité post-synaptique (PSD), un compartiment fonctionnel composé de nombreuses protéines, du cytosquelette, d'échafaudage et de signalisation ; certaines de celles-ci établissent un contact direct avec le domaine cytoplasmique des récepteurs (Kennedy MB, 1998; Gardoni F *et al.*, 2001). La PSD garantit la rapidité des réponses de libération des neurotransmetteurs et fournit un mécanisme moléculaire qui couple le flux d'ions aux mécanismes de signalisation intracellulaire.

Au niveau de la fente synaptique, les transporteurs GLAST (Glial high affinity glutamate transporter) et GLT-1 (Glutamate transporter 1) règle la concentration de glutamate, qui ensuite, au niveau des astrocytes, est métabolisé en glutamine. En fin, les neurones sont capables de recapter la glutamine, relâchée des astrocytes dans le milieu extracellulaire, et de la reconvertir en glutamate. Il devient ainsi compréhensible que la défaillance d'un de ces événements provoque l'élévation du glutamate.

Dans ces cas, on parle d'excitotoxicité directe, qui peut aussi être induite artificiellement par des analogues du glutamate tels que l'acide kainique et l'acide quinolinique (QA), et a été impliquée dans la mort neuronale observée dans plusieurs maladies neurodégénératives.

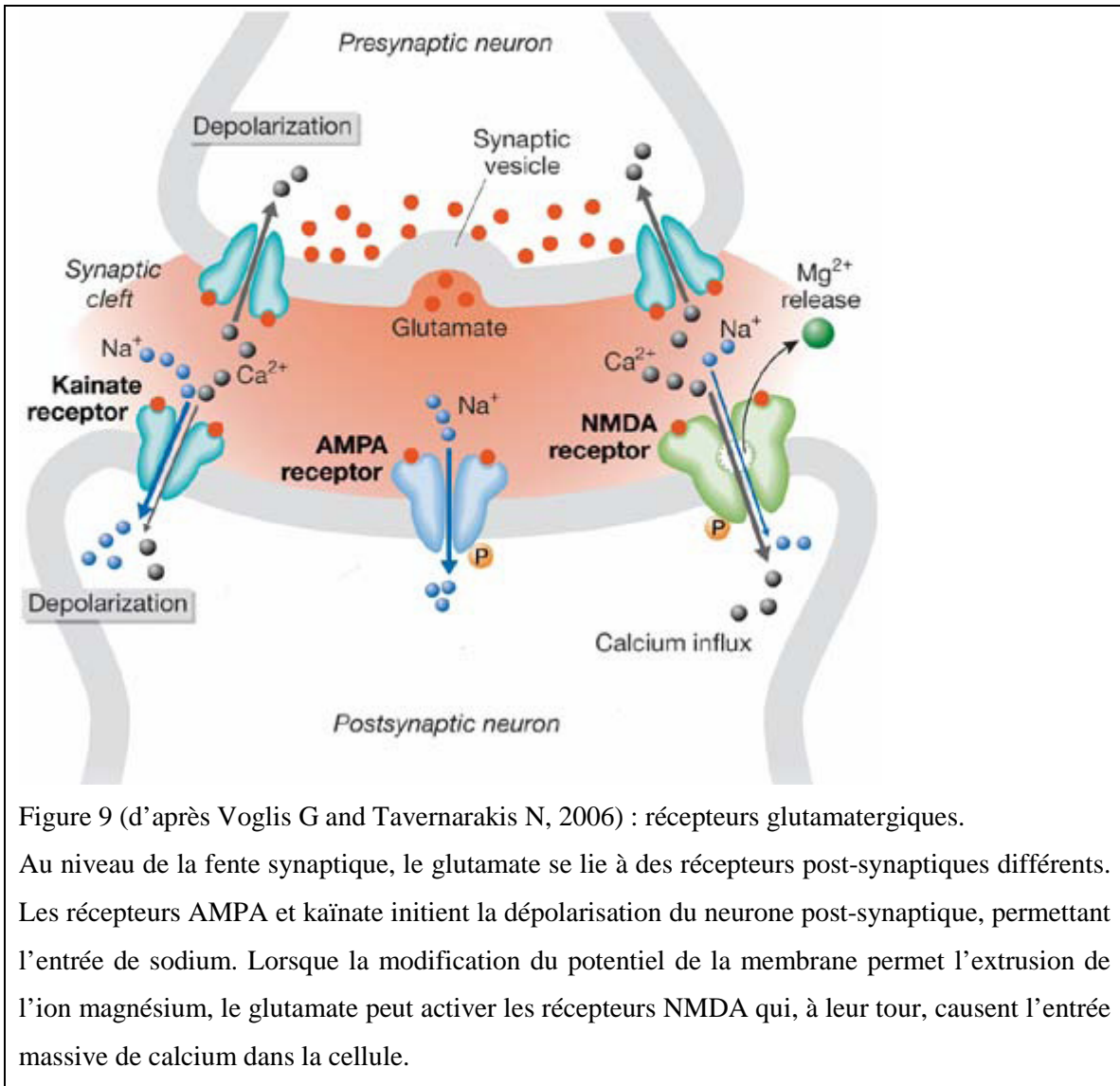


Figure 9 (d'après Voglis G and Tavernarakis N, 2006) : récepteurs glutamatergiques.

Au niveau de la fente synaptique, le glutamate se lie à des récepteurs post-synaptiques différents. Les récepteurs AMPA et kainate initient la dépolarisation du neurone post-synaptique, permettant l'entrée de sodium. Lorsque la modification du potentiel de la membrane permet l'extrusion de l'ion magnésium, le glutamate peut activer les récepteurs NMDA qui, à leur tour, causent l'entrée massive de calcium dans la cellule.

III.3.2 L'excitotoxicité au cours des maladies MH et MP

III.3.2.a L'excitotoxicité au cours de la MH

L'administration intrastriatale de certains agonistes des récepteurs du glutamate, comme l'acide quinolinique, reproduit fidèlement certaines des caractéristiques biochimiques de la MH, telles que la dégénérescence préférentielle de neurones GABAergiques en préservant les interneurons et les afférences dopaminergiques chez le rat (Beal MF *et al.*, 1986 and 1988) et chez les primates non humains (Hantraye P *et al.*, 1990; Schumacher JM *et al.*, 1992; Ferrante R *et al.*, 1993).

Au cours de la MH, les phénomènes d'excitotoxicité, ainsi que leur sélectivité, se produisent par la combinaison de mécanismes liés aux propriétés des récepteurs NMDA des neurones de projection et des interneurons striataux et à la présence de l'expansion du domaine polyQ de la HTT mutée.

Les propriétés intrinsèques des récepteurs NMDA dépendent de leur composition en sous-unités.

Presque toutes les populations de neurones du striatum expriment la sous-unité NR1, responsable de la fonctionnalité du récepteur, à niveaux élevés.

Par contre la composition en sous-unités NR2 est variable ; ces sous-unités régulatrices, déterminent par exemple l'augmentation de la perméabilité et le temps de désactivation du canal, ainsi que les changements dans sa sensibilité au magnésium, Mg^{2+} ou à la glycine.

Les neurones de projection du striatum expriment majoritairement la sous-unité NR2B et minoritairement la sous-unité NR2A, lorsque les interneurons expriment majoritairement NR2D et des faibles niveaux de NR2A et NR2C.

Les interneurons striataux sont résistants à l'excitotoxicité médiée par le NMDA à cause du manque des sous-unités NR2A/B qui présentent une majeure affinité pour le QA par rapport aux sous-unités NR2C ou NR2D (Buller AL *et al.*, 1994; Schoepfer R *et al.*, 1994; Standaert DG *et al.*, 1994; Landwehrmeyer GB *et al.*, 1995; Chen Q and Reiner A, 1996; Chen Q *et al.*, 1996; Ghasemzadeh MB *et al.*, 1996; Chen N *et al.*, 1999).

De manière consistante les récepteurs NMDA NR1/NR2B sont peu représentés dans le cervelet ou dans les autres zones peu affectées au cours de la MH (Monyer H *et al.*, 1994; Goebel DJ and Pooch MS, 1999; Thompson CL *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les mécanismes liés à la HTT mutée, la présence de l'expansion du domaine polyQ altère, en la diminuant, l'affinité de la HTT pour la protéine PSD-95 : la quantité de PSD-95 disponible à l'interaction avec la sous-unité NR2 des récepteurs NMDA, le recrutement de la Src Tyrosine Kinase et la phosphorylation/activation des récepteurs NMDA augmentent proportionnellement (Sun Y *et al.*, 2001; Song C *et al.*, 2003; Ali DW and Salter MW, 2001).

De plus, l'interaction de la HTT avec les protéines du cytosquelette (décrite dans la section IV. Mécanismes pathogéniques au cours de la MH) pourrait être déterminante à la localisation et, par conséquent, à la fonction des récepteurs glutamatergiques (Scannevin RH and Huganir RL, 2000) et pourraient être altérées en présence de l'expansion pathologique du domaine polyQ, contribuant aux mécanismes d'excitotoxicité directe.

III.3.2.b L'excitotoxicité au cours de la MP

Les propriétés intrinsèques des neurones dopaminergiques de la SNc rendent compte de leur vulnérabilité préférentielle. D'une part les neurones dopaminergiques sont vulnérables au stress oxydant secondaire à l'accumulation des produits de l'oxydation de la dopamine ; de plus, ils s'appuient sur les canaux du Ca^{2+} type L (Long Lasting) 1,3 dépendants du voltage, plutôt que sur les canaux du sodium pour leur activité de 'pacemaker', ce qui les expose à un afflux continu de Ca^{2+} provoquant ou aggravant à long terme un défaut mitochondrial, par compromission de la capacité mitochondriale de stocker le Ca^{2+} (Chan CS *et al.*, 2007), et contribuant à l'excitotoxicité indirecte.

Ces neurones sont également vulnérables à l'excitotoxicité directe, car ils reçoivent des afférences glutamatergiques du noyau STN.

Comme pour la MH, au cours de la MP des changements de composition en sous-unités des récepteurs NMDA des MSNs striataux ont été observés à la suite de la dénervation dopaminergique; ces changements reflètent les phases de progression de la maladie (revu dans Picconi B *et al.*, 2012).

III.3.3 Toxicité dopaminergique au cours de la MH

Du point de vue de la neurophysiologie, les projections GABAergiques des MSNs striataux projettent sur les corps cellulaires et sur les terminaisons des neurones dopaminergiques de la SNc. Ces projections normalement inhibent le relais de la dopamine (Smith AD and Bolam JP, 1990; Paladini CA *et al.*, 1999).

Au cours de la MH la dégénérescence des MSNs striataux cause l'hyperactivité de la voie nigro-striée dopaminergique, qui se traduit cliniquement dans des phénomènes de chorée. Cette hyperactivation a été démontrée dans plusieurs études : *post mortem* les études de neuropathologie montrent que la neurodégénérescence suit le gradient de concentration de dopamine ; *in vivo* la neuroimagerie fonctionnelle et les analyses biochimiques montrent l'hyperactivation de la transmission dopaminergique et des taux élevés de dopamine ou de son enzyme de production, la tyrosine hydroxylase TH (Vonsattel JP *et al.*, 1985; Vonsattel JP and DiFiglia M, 1998; Garrett MC and Soares-da-Silva P, 1992 ; Bird ED *et al.*, 1980; Backman L *et al.*, 1997; Ginovart N *et al.*, 1997).

De plus, à l'appui de cette hypothèse il a été montré que l'antagoniste de la dopamine tétrabénazine (TBZ) réduit efficacement la chorée chez les patients MH (Huntington Study Group, 2006).

In vitro, l'application de dopamine accroît significativement la formation des agrégats et la mort neuronale en présence de la HTT mutée (Charvin D *et al.*, 2005; Benchoua A *et al.*, 2008).

La toxicité de la dopamine serait la conséquence de l'activation des récepteurs D2 présents sur les MSNs de la voie indirecte, relativement plus vulnérables que les neurones de la voie directe. L'activation des récepteurs D2 par la dopamine déterminerait l'augmentation de la signalisation JNK/c-jun (Charvin *et al.*, 2005; Charvin *et al.*, 2008) et la diminution de l'expression du complexe II mitochondrial, qui potentialise la toxicité de la HTT mutée (Benchoua A *et al.*, 2008). De manière spéculative, l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs diminue la mort cellulaire observée *in vitro* (Charvin D *et al.*, 2005; Charvin D *et al.*, 2008).

Les récepteurs D1 participent aussi à la vulnérabilité du striatum. En effet il a été récemment suggéré que des dysfonctions des MSNs de la voie directe pourraient apparaître précocement au cours de la MH (Raymond LA *et al.*, 2011).

Les récepteurs D1 semblent être un point de rencontre de la voie dopaminergique et glutamatergique. En présence de la HTT mutée l'activation des récepteurs D1 induit une plus forte mortalité cellulaire (Paoletti P *et al.*, 2008) et augmente la toxicité induite par le glutamate (Tang TS *et al.*, 2007).

III.3.4 Autres systèmes de récepteurs modulateurs de la toxicité des neurotransmetteurs

D'autres systèmes de récepteurs modulant la neurotransmission cathécolaminergique - tels que les récepteurs de l'Adénosine, types 1 ou 2 - ou la libération du Ca^{2+} intracellulaire - tels que les récepteurs cholinergiques de la nicotine, nAChRs, ou ceux de la Ryanodine, RyRs et les récepteurs Ins3P, InsP3R - jouent un rôle dans les phénomènes excitotoxiques au cours des maladies MP et MH.

Les récepteurs de l'Adénosine

La caféine, un antagoniste non sélectif des récepteurs de l'adénosine a un effet de protection contre la dégénérescence neuronale dans la MP. Les récepteurs de l'adénosine (types 1 et 2), sont des cibles possibles de la caféine. Il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), dont l'activité est induite par l'adénosine. Dans le système nerveux central les récepteurs A2A de l'adénosine (A2ARs) sont sélectivement exprimés dans le striatum, principalement au niveau postsynaptique dans les neurones striopallidaux qui expriment les récepteurs dopaminergiques D2 (Ferre S *et al.*, 1997). A ce niveau ils forment des complexes oligomériques avec les récepteurs D2. La caféine par son effet d'inhibition de l'action des récepteurs A2AR, faciliterait l'action des récepteurs D2 résultant dans l'amélioration des effets de la dénervation dopaminergique (Prediger RD, 2010).

Au contraire, au cours de la MH la consommation des plus grandes quantités de caféine serait corrélée à une péjoration du phénotype, vue par l'âge plus précoce de l'apparition des symptômes (Simonin C *et al.*, 2013).

Toutefois la caféine n'a pas une action sélective : l'hyperactivation des récepteurs A1 a aussi été démontrée dans la MH, qui pourrait expliquer l'action de la caféine (Blum D *et al.*, 2002).

Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, nAChRs

Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine nAChRs sont des complexes pentamériques intramembranaires, responsables d'un effet excitateur, par activation des canaux type T (Transient) du Ca^{2+} dépendants du voltage, sur les cellules dopaminergiques (Toulorge D *et al.*, 2011). Leur rôle a été mis en cause au cours de la MP. En effet, d'une part les études post mortem sur les échantillons des patients MP ont révélé que la perte sélective des projections cholinergiques excitatrices en provenance de la région peduncolopontine est corrélée à la dégénérescence dopaminergique (Karachi C *et al.*, 2010; Maskos U, 2010). D'autre part l'implication des récepteurs nAChRs a été démontrée, vu que la nicotine, l'agoniste majeure de ces récepteurs, protège contre la dégénérescence dopaminergique dans différents modèles (Quik M *et al.*, 2007).

Le récepteur RyR

Une autre cible de la caféine est représentée par le récepteur de la ryanodine, le médiateur de la CICR, 'Ca²⁺ Induced Ca²⁺ Release' au niveau du réticulum endoplasmique (Avidor T *et al.*, 1994). Il a de fait été montré que le dantrolène, l'inhibiteur de ces récepteurs, protège les neurones de la dégénérescence au cours des différents phénotypes pathologiques neurologiques, y compris la MH (Chen X *et al.*, 2011; Oules B *et al.*, 2012; Suzuki M *et al.*, 2012).

L'isoforme 3 des RyRs est exprimée dans le cerveau ; ces récepteurs sont sensibles aux mécanismes redox avec des conséquences physiologiques et pathologiques dans les neurones (Hidalgo C *et al.*, 2005). Les RyRs se localisent dans plusieurs populations neuronales du Système Nerveux Central. Au niveau subcellulaire ils sont représentés dans les axones, les épines dendritiques et dans les fractions des vésicules synaptiques. Au cours du développement les RyRs, comme les InsP3Rs, ont été associés au développement des neurites et à la synaptogenèse.

Le récepteur InsP₃R

Ceci est un canal de libération du Ca^{2+} intracellulaire ; situé à la membrane du réticulum endoplasmique, il est activé par l'inositole trisphosphate (IP3).

L'isoforme 1 de l' InsP3R1 prédomine dans les neurones.

Dans les neurones primaires du rat seule la HTT mutée, et non la sauvage, serait capable de s'associer directement à la région carboxy-terminale de InsP3R1, et faciliterait la libération de Ca^{2+} (Tang TS *et al.*, 2003). De façon très intéressante il a été démontré que la normalisation de cette interaction pathologique prévient la mort neuronale dans un modèle murin MH (YAC 128) (Tang TS *et al.*, 2009).

La mitochondrie et l'homéostasie du Ca^{2+}

Pour son rôle de système tampon de la concentration de Ca^{2+} au cours de la neurotransmission, la mitochondrie est considérée comme un des systèmes médiateurs des mécanismes d'excitotoxicité indirecte.

Ce rôle est expliqué en détail dans le Chapitre 2, section VI : La fonction mitochondriale et son implication dans la MH et la MP

III.4 La neuroinflammation

III.4.1 Le processus neuro-inflammatoire

Le processus neuro-inflammatoire dans le SNC est censé jouer un rôle crucial dans la pathogénie des maladies neurodégénératives.

La persistance des mécanismes délétères pour les neurones, tels que l'on a vu dans les paragraphes précédents, déclenche des modifications dans le microenvironnement et l'activation des cellules gliales.

Les macrophages résident du SNC, la microglie, en représente 10% des cellules et constituent une première ligne de défense contre les agressions de différents types (infectifs, traumatiques etc) (Lawson LJ *et al.*, 1990; Kreutzberg GW, 1996). Leur activation correspond à des changements morphologiques et immunophénotypiques (Dheen ST *et al.*, 2007; Ransohoff RM and Perry VJ, 2009). Dans des conditions d'activation modérée ils soutiennent la croissance et la différenciation neuronale, éliminant les débris cellulaires. Dans des conditions d'activation prolongée la microglie locale, située déjà dans les zones endommagées, et les macrophages qu'y migrent en réponse aux chémoquines attractives, subissent des modifications visant à favoriser leur adhésion aux neurones et à entraîner la production de cytokines, NO - par activation de l'iNOS - et d'autres médiateurs inflammatoires qui peuvent contribuer à la mort neuronale (Wang JY *et al.*, 2006; Aloisi F, 2001; Aloisi F *et al.*, 2000).

Les oligodendrocytes prennent aussi part à la réponse gliale augmentant la synthèse de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP, pour Glial Fibrillar Acidic Protein) et de la connexine 43 aux jonctions gap.

La production de radicaux libres augmente à la suite de l'activation des enzymes iNOS, et des NADPH oxydases dans la microglie et les astrocytes (pour revue Amitai Y, 2010; Tansey MG *et al.*, 2007). Les NADPH oxydases, NOXs, existent en 5 isoformes ; dans le SNC elles sont exprimées différemment dans les différents types cellulaires, neurones, astrocytes et microglie. Il s'agit d'enzymes qui visent à transférer les électrons du NADPH cytoplasmique à travers les membranes, dans l'espace extracellulaire ou dans le lumen des organites ; ces électrons réduisent l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire du coenzyme FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) ou de groupes prosthétiques hème,

généralant la production des EROs, $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Radermacher KA *et al.*, 2013; Jaquet V and Bedard K, 2009).

L'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 le facteur de nécrose tumoral α , (Tumor Necrosis Factor TNF- α), et l'augmentation de la production des EROs et des ERAs prennent part aux changements du microenvironnement neuronal, entraînant une réaction inflammatoire associée probablement à l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Kortekaas R *et al.*, 2005), et contribuent à la dégénérescence (pour une revue Hirsch EC *et al.*, 2005).

A l'appui de l'importance du processus neuroinflammatoire au cours de la pathogénie des maladies neurodégénératives, récemment plusieurs évidences ont émergé des études faites sur la Sclérose en Plaques prouvant la coexistence d'un processus de neurodégénérescence au cours de cette maladie démyélinisante du SNC dont la cause primaire est reconnue dans l'auto-immunité et l'inflammation (revu dans Dutta R and Trapp BD, 2011).

III.4.2 Évidences de neuroinflammation au cours des maladies MP et MH

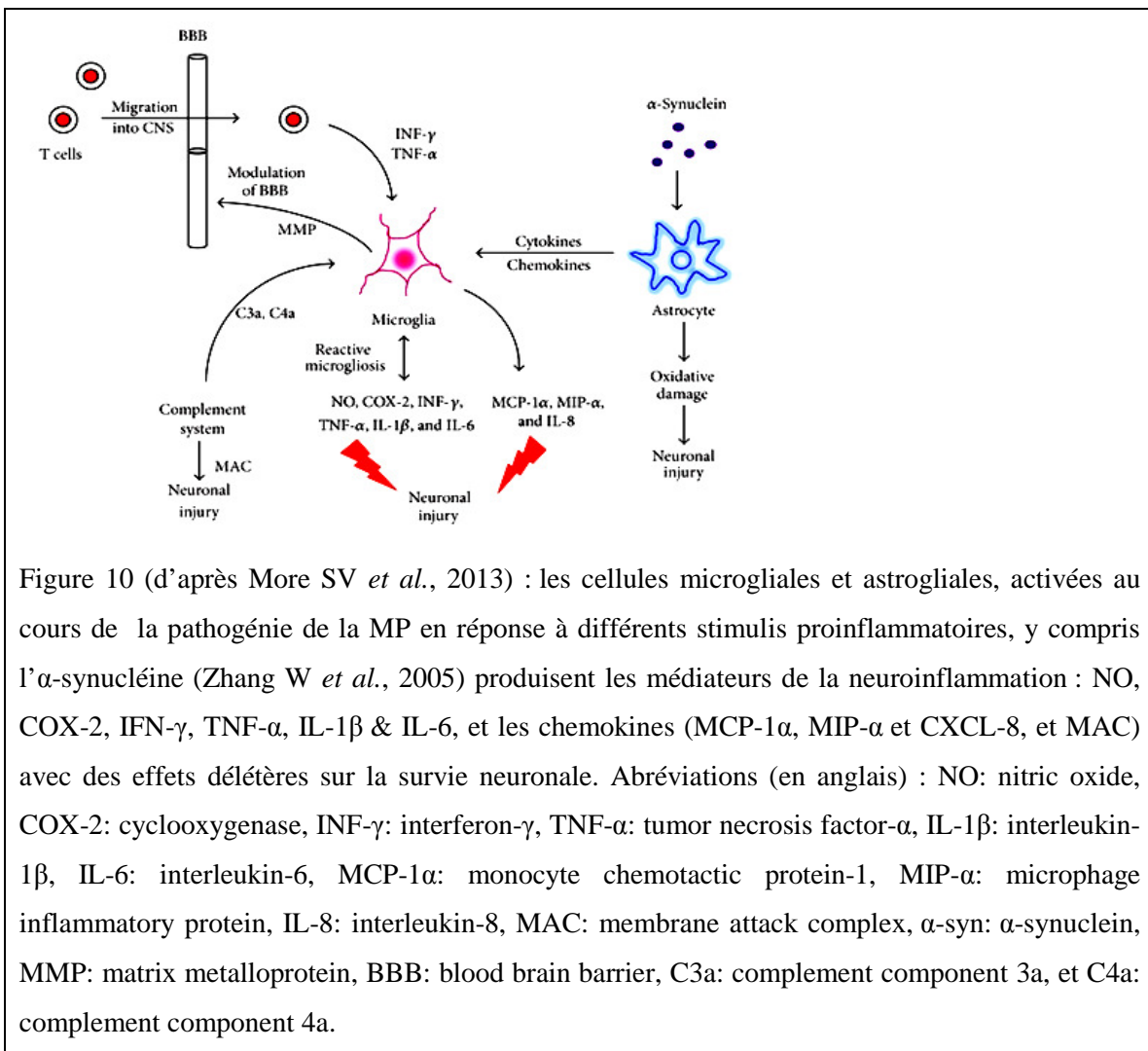
La prolifération et l'activation de la microglie dans le SNC a été documentée dans l'analyse *post mortem* des patients atteints de MP (McGeer P *et al.*, 1988; Langston JW *et al.* 1999; Mogi M *et al.*, 1994a and b; Imamura K *et al.*, 2003) et dans les modèles animaux de MP (Czlonkowska A *et al.*, 1996; Kim YJ *et al.*, 2009).

Dans un modèle expérimentale un syndrome parkinsonien a été induit par exemple par injection intranigrale du lypopolysaccharide, un puissant inducteur de l'inflammation (Qin L *et al.*, 2013). D'autre part l'invalidation du gène codant pour la Cyclooxygenase, Cox, l'enzyme limitant pour la production des prostaglandines inflammatoires E2, protège contre la dégénérescence dans un modèle MP induite par l'administration de MPTP (Teismann P *et al.*, 2003).

Ainsi, pour la MH l'analyse *post mortem* des cerveaux des patients atteints a révélé l'occurrence de la prolifération gliale dans les zones proches des neurones dégénérants (McGeer P *et al.*, 1988; Messmer K and Reynolds GP, 1998; Singhrao SK *et al.*, 1999; Sapp E *et al.*, 2001). L'augmentation des cytokines inflammatoires a aussi été

documentée dans le striatum et dans le plasma des patients (Dalrymple A *et al.*, 2007; Björkqvist M *et al.*, 2008).

Toutefois l'expérimentation de plusieurs médicaments anti-inflammatoires au cours de protocoles mis en œuvre pour contrecarrer la neurodégénérescence a produit des résultats controversés ; ceci peut être expliqué par le fait que les différents médicaments expérimentés (salicilate, aspirine, meloxicam, indometacin, paracetamol, diclofenac, ibuprofen etc.) ont des profils pharmacologiques et des spécificités différentes ; d'autre part la réponse neuroinflammatoire n'est pas spécifique d'une condition dégénérative déterminée.



IV. Mécanismes pathogéniques au cours de la MH

| | | |
|-------------|---|--------------|
| IV.1 | Les différents modèles de MH et leur utilité | p. 74 |
| IV.2 | La structure de la HTT | p. 77 |
| IV.3 | Rôle physiologique de la HTT et conséquences de la présence de l'expansion du domaine polyQ. | p. 80 |
| IV.3.1 | Rôle dans la transcription | p. 80 |
| | Plusieurs facteurs de transcriptions interagissent avec la HTT | p. 80 |
| | HTT et REST | p. 83 |
| | Implication des miRNAs | p. 84 |
| | HTT et le complexe TORC-CREB | p. 84 |
| | HTT mutée interfère avec l'expression des récepteurs des neurotransmetteurs | p. 85 |
| IV.3.2 | Rôle dans la dynamique des vésicules et le transport axonal ; interaction avec les protéines HIP et HAP | p. 85 |
| IV.3.3 | Rôle dans l'embryogenèse et la neurogénèse | p. 90 |
| IV.3.4 | Rôle anti-apoptotique et pro-survie | p. 91 |
| IV.4 | La HTT mutée. Propriétés et mécanismes pathogéniques additionnels | p. 94 |
| IV.4.1 | Le clivage de la HTT mutée | p. 94 |
| IV.4.2 | Formation des agrégats | p. 96 |
| IV.4.3 | Dérégulation du Système Ubiquitine-Protéasome au cours de la MH | p. 98 |
| IV.4.4 | La HTT mutée et l'autophagie | p. 99 |
| IV.4.5 | La dysfonction mitochondriale au cours de la MH | p. 103 |

IV.1 Les différents modèles de MH et leur utilité

Au cours des années, différents modèles de MH ont été générés : insectes (*Drosophila melanogaster*) (Jackson GR *et al.*, 1998), invertébrés (*Caenorhabditis elegans*) (Faber PW *et al.*, 2002), divers modèles de rongeurs, un ovin transgénique (Jacobsen JC *et al.*, 2010), deux modèles de porc (Yang D *et al.*, 2010; Baxa, M *et al.*, 2013) et récemment un modèle transgénique de primate non humain (Yang SH *et al.*, 2008).

La création de modèles très simples comme les insectes et les invertébrés s'est révélée très utile dans les études de 'screening' pour identifier les gènes candidats qui puissent réduire ou modifier le phénotype de la maladie (Kazemi-Esfarjani P and Benzer S, 2000; Warrick JM *et al.*, 1999; Parker JA *et al.*, 2001). En revanche, ces modèles se révèlent limités dans l'étude des phénomènes de sélectivité des phénomènes dégénératifs pour une population neuronale.

Différents modèles de rongeurs, souris et rats, existent pour la MH exprimant la forme entière ou des fragments N-terminaux de différentes tailles de la HTT mutée. Ces modèles ont été extensivement étudiés.

Les modèles murins se sont révélés utiles dans la caractérisation des phénomènes de clivage de la protéine mutée et de la formation des agrégats ; les modèles de rats sont plus adéquats pour caractériser le phénotype comportemental.

Des approfondissements sur les modèles rongeurs sont compris dans la section VII, Projet I, car certains entre eux ont été l'objet de mes recherches.

La disponibilité des modèles ovins, porcins et de primate non humain a fourni des détails fondamentaux à la compréhension de la pathogénie de la MH.

Un phénotype clinique typique de la MH, avec la présence de mouvements choréiques, la dystonie et la mort précoce a été décrit pour le singe (HTT N-terminale mutée avec 84Q) et le porc (HTT N-terminale mutée avec 105Q) transgéniques pour la MH.

L'étude des singes MH a aussi révélée que la dégénérescence liée à l'HTT mutée affecte préférentiellement les procès neuronaux, épargnant le corps cellulaire (Yang SH *et al.*, 2008). En revanche les phénomènes d'apoptose ont été mis en évidence dans le modèle porcine (Yang D *et al.*, 2010) et la diminution significative d'un marqueur des MSNs striataux, la protéine DARPP32, a été révélée par l'étude du mouton transgénique (HTT

N-terminale mutée avec 73Q) (Jacobsen JC *et al.*, 2010) et dans le deuxième modèle porcin (Baxa M, *et al.*, 2013; pour une revue Pouladi MA, 2013). Des différences dans l'organisation et les caractéristiques physiologiques des circuits du cerveau rendent compte de résultats hétérogènes : i) la capacité cellulaire de réagir à la présence des protéines mal repliées, soit les systèmes de protéostasie et de contrôle de qualité différent selon l'âge et les espèces ; ii) la maturation rapide des neurones de rongeurs durant le développement du cerveau pourrait réduire leur sensibilité aux protéines mal repliées, ce qui peut aussi expliquer pourquoi les modèles de souris peuvent atteindre l'âge adulte. De plus, iii) les circuits du cerveau chez les porcs et les singes sont plus complexes que chez la souris et cette complexité expliquerait leur plus grande vulnérabilité à la toxicité de la HTT mutée et mal repliée.

Des études récentes ont exploré l'utilité des cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem Cells, ESCs) et des cellules souches pluripotentes induites (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) comme modèles cellulaires pour la recherche sur les maladies.

Les ESCs humaines ont été générées grâce à la donation d'embryons humains MH (41-51 CAGs), mais aussi de blastocystes, issues de la fertilisation *in vitro*, implantées dans les couches nourricières de la souris (Mateizel I *et al.*, 2006; Bradley CK *et al.*, 2011; Niclis J *et al.*, 2009).

Des ESCs ont aussi été dérivées des modèles transgéniques murins. Ces modèles ont révélé que la HTT mutée peut déterminer l'accélération des procès des différenciations (Lorincz MT and Zawistowski VA, 2009) ; ces modèles récapitulent aussi, lorsqu'on induit leur différenciation en cellules neuronales, les caractéristiques pathologiques qu'on retrouve dans les neurones de l'animal adulte (Cha JH, 2007).

La découverte que les fibroblastes humains peuvent être reprogrammés en ESCs (Takahashi K *et al.*, 2007) a transformé les perspectives dans l'étude et la possibilité de traitement des maladies humaines, y compris les maladies neurodégénératives et la MH (Ebert AD *et al.*, 2009; Egawa N *et al.*, 2012, The HD iPSC Consortium, 2012; Tiscornia G *et al.*, 2011; Kaye JA and Finkbeiner S, 2013). De fait l'évolution des stratégies iPSC a déterminé l'avancement des thérapies de transplant cellulaire personnel, ainsi que la

production de modèles *in vitro* pour la recherche biomédicale et la découverte de nouveaux médicaments.

En plus de ces modèles, des lignées cellulaires ont été générées pour modéliser la MH *in vitro*. Celles-ci comprennent des cellules dérivées des progéniteurs striataux d'un modèle de souris, et modèles où l'expression de la HTT exogène a été induite de façon stable ou transitoire. Ces modèles se sont aussi révélés utiles dans la caractérisation des mécanismes pathogéniques au cours de la MH, comme par exemple les défauts mitochondriaux (revu dans Damiano M *et al.*, 2010).

IV.2 La structure de la HTT

La HTT sauvage et ses homologues sont des protéines évolutivement très conservées parmi différentes espèces de vertébrés et invertébrés. Chez l'homme la HTT, d'environ 350 kDa, est codée par le gène *IT15*, qui consiste en 67 exons, 180Kb (OMIM 613004). Le gène *IT15* humain est exprimé de manière ubiquitaire avec de hauts niveaux dans le système nerveux central.

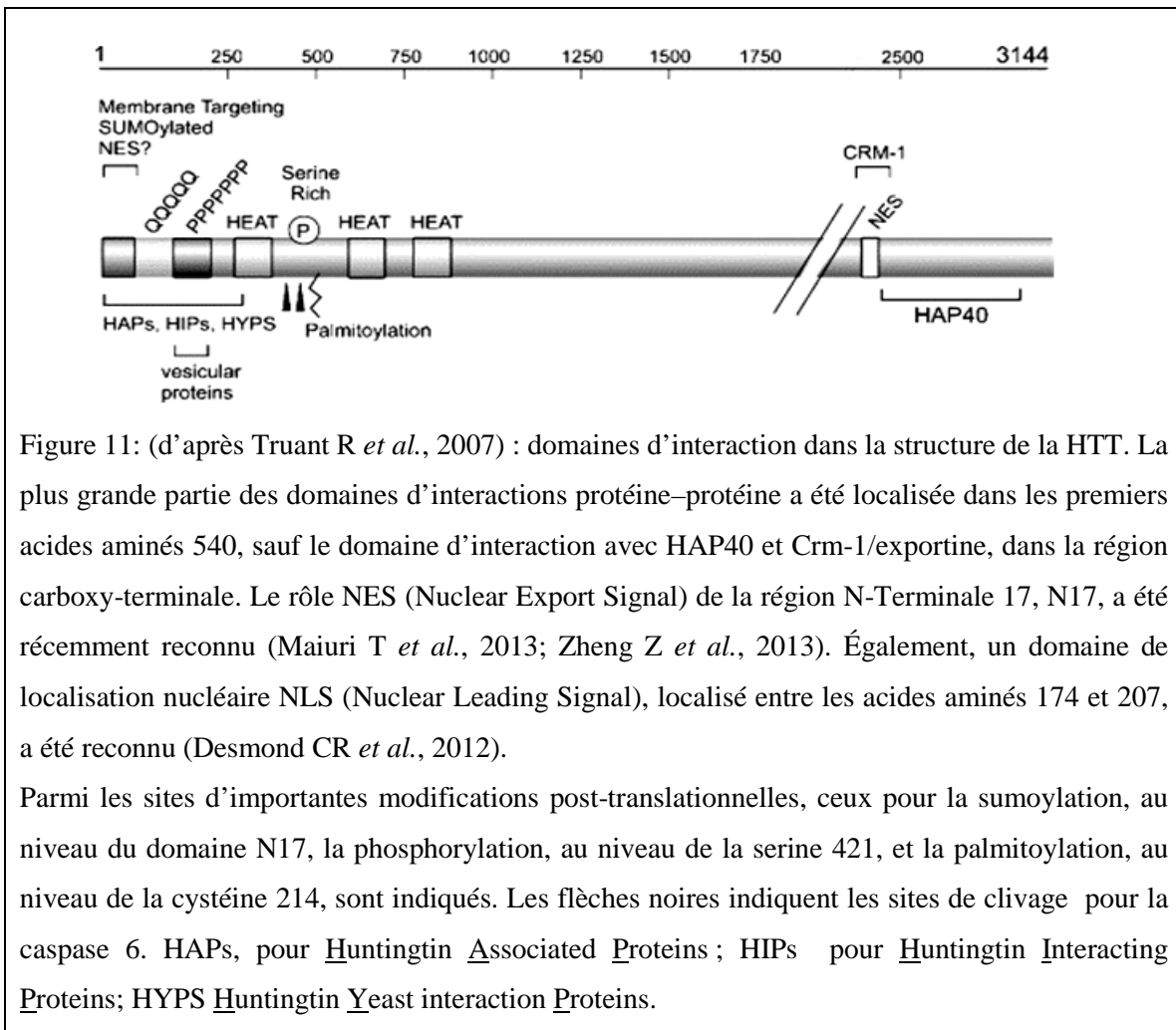


Figure 11: (d'après Truant R *et al.*, 2007) : domaines d'interaction dans la structure de la HTT. La plus grande partie des domaines d'interactions protéine-protéine a été localisée dans les premiers acides aminés 540, sauf le domaine d'interaction avec HAP40 et Crm-1/exportine, dans la région carboxy-terminale. Le rôle NES (Nuclear Export Signal) de la région N-Terminal 17, N17, a été récemment reconnu (Maiuri T *et al.*, 2013; Zheng Z *et al.*, 2013). Également, un domaine de localisation nucléaire NLS (Nuclear Leading Signal), localisé entre les acides aminés 174 et 207, a été reconnu (Desmond CR *et al.*, 2012).

Parmi les sites d'importantes modifications post-traductionnelles, ceux pour la sumoylation, au niveau du domaine N17, la phosphorylation, au niveau de la serine 421, et la palmitoylation, au niveau de la cystéine 214, sont indiqués. Les flèches noires indiquent les sites de clivage pour la caspase 6. HAPs, pour Huntingtin Associated Proteins ; HIPs pour Huntingtin Interacting Proteins; HYPS Huntingtin Yeast interaction Proteins.

La région N-Terminal de 17 acides aminés (N17) est très conservée dans les différentes espèces. A ce domaine N17 avait été assigné un rôle pour la rétention de la protéine dans le cytoplasme et l'interaction avec le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Steffan JS *et al.*, 2004; Atwal RS *et al.*, 2007; Rockabrand E *et al.*, 2007).

Récemment le rôle de NES (Nuclear Export Signal), reconnu par la protéine exportine 1, ou CRM 1 (pour Chromosome Region Maintenance-1), a été attribué à ce domaine (Maiuri T *et al.*, 2013; Zheng Z *et al.*, 2013). Par ailleurs précédemment il avait été observé que sa suppression provoque l'accumulation nucléaire des fragments de HTT (Schilling G *et al.*, 2004).

Le domaine N17 assume une structure α -hélicoïdale bipolaire (Kim MW *et al.*, 2009), et est la cible des modifications post-translotionnelles, y compris l'acétylation (Thompson LM *et al.*, 2009), la sumoylation (Steffan JS *et al.*, 2004), et la phosphorylation (Atwal RS *et al.*, 2011; Aiken CT *et al.*, 2009; Thompson LM *et al.*, 2009). En dehors du domaine N17, d'autres modifications post-translotionnelles apparaissent, comme la phosphorylation de la sérine 421 et la palmytoilation de la cystéine 214 (Zala D *et al.*, 2008; revu dans Truant R *et al.*, 2007). Les modifications post-translotionnelles servent à régler les fonctions, la localisation et la toxicité de la protéine.

Un deuxième domaine NES, reconnu par CRM 1, est localisé dans la portion C-Términale de la protéine (Xia J *et al.*, 2003).

A la région N17 suivent les domaines poly-glutamine (polyQ) et poly-proline (polyP).

Le domaine polyQ commence au dix-huitième acide aminé, il permet l'interaction avec de nombreuses protéines.

Chez les vertébrés il est suivi d'un premier domaine polyP, constitué de 11 résidus de proline chez l'homme. Ce domaine polyP est important pour la solubilité de la protéine et joue un rôle dans le changement de conformation du segment de polyQ pathologique (Darnell G *et al.*, 2007). *In vitro* les séquences polyP retardent la formation de structures feuillettes β au sein des agrégats et en même temps augmentent la concentration de peptide polyQ nécessaire pour leur formation (Bhattacharyya A *et al.*, 2006).

Les 3 domaines HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR) sont longs d'environ quarante acides aminés et sont organisés en clusters. La signature du motif HEAT est la présence d'Aspartate et d'Arginine respectivement en position 19 et 25. Les domaines HEAT forment des structurés hélicoïdales α . La nature relativement hydrophobe de ces séquences suggère qu'elles sont tassées l'une contre l'autre,

regroupées autour d'un axe central, pour constituer un domaine fonctionnel qui contribue à déterminer la capacité d'interaction de la HTT avec les autres protéines. On retrouve ces domaines dans les protéines impliquées dans les processus de transport (Andrade MA and Bork P, 1995).

Un domaine de localisation nucléaire NLS (Nuclear Leading Signal) est également présent entre les acides aminés 174 et 207 (Desmond CR *et al.*, 2012) ; il s'agit d'un domaine non-classique, proline-tirosine, ou PY-NLS, caractérisé par une séquence appelée « Intervening Sequence » ou IVS nécessaire pour son interaction avec les récepteurs d'import karyopherin $\beta 1$ and $\beta 2$. Ce type de domaine NLS est aussi présent dans le facteur d'export nucléaire de l'ARN (NXF1).

Des sites de clivage pour les caspases, 3, 2 et 6 (Wellington CL *et al.*, 1998; Wellington CL and Hayden MR, 2000; Graham RK *et al.*, 2010) et pour la calpaïne (Gafni J and Ellerby LM, 2002) sont aussi présents sur la protéine.

IV.3 Rôle physiologique de la HTT et conséquences de la présence de l'expansion du domaine polyQ.

La HTT a normalement plusieurs rôles physiologiques. Son rôle dans la régulation de la transcription, du trafic des vésicules, du transport axonal ainsi que son rôle anti-apoptotique et pro-survie, pendant l'embryogenèse, la neurogénèse et le développement sont largement documentés.

Au cours de la MH l'expansion du trait CAG serait responsable de différents mécanismes pathogéniques : la perte de certaines fonctions physiologiques de la HTT coexiste avec l'acquisition des nouvelles propriétés toxiques de la protéine.

IV.3.1 Rôle dans la transcription

Plusieurs facteurs de transcriptions interagissent avec la HTT

La HTT a un rôle dans la régulation de la transcription. Comme pour les autres protéines possédant un domaine polyQ, l'interaction entre la HTT et plusieurs facteurs de transcription a été documenté (revu dans Okazawa H, 2003). Dans le cas de la HTT ces interactions, directes ou *via* ses partners comme HAP (pour Huntingtin Associated Protein), peuvent avoir lieu dans le cytoplasme, la HTT pouvant faire fonction de protéine 'shuttler' cytoplasme-noyau pour différents de ces facteurs ; la HTT peut aussi interagir avec les facteurs de transcription dans le noyau.

La HTT interagit avec :

- CBP, la protéine qui lie CREB (Cyclic AMP Response Element Binding Protein) (McC Campbell A *et al.*, 2000; Steffan JS *et al.*, 2000)

La protéine CBP est une protéine d'échafaudage sur laquelle différents types de facteurs de transcription se réunissent. En plus d'un domaine pour lier CREB, CBP contient plusieurs domaines pour l'interaction avec les facteurs de transcription y compris : trois domaines zinc-finger, un bromo-domaine, un domaine riche en glutamine, un domaine pour la deacétylation des histones, HAT (histone deacetylase). Plus de 40 partners de CBP ont été reconnus.

- TBP, la protéine liant le « TATA box » (TATA box Binding Protein) ; TBP est la protéine composant la plus importante du complexe TFIID, au niveau duquel plus de 10 protéines TAFs (TBP Associating Factors) s'associent. Elle recrute l'ARN Polymerase II à la région du promoteur de l'ADN du gène cible. La protéine TBP

se retrouve séquestrée dans les agrégats en présence de la HTT mutée (Prigge JR and Schmidt EE *et al.*, 2007)

- p53 (McCampbell A *et al.*, 2000; Steffan JS *et al.*, 2000), un des facteurs de transcription les mieux connus pour régler divers effets physiologiques, y compris l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.
- le corépresseur nucléaire NcoR (Nuclear co-Repressor), un répresseur nucléaire pour les récepteurs des stéroïdes (Boutell JM *et al.*, 1999). Il fait partie d'un complexe répresseur avec les déacétylases des histones, HDACs, et les déméthylases.
- CA150, un facteur capable de se lier au domaine C-Terminal hyperphosphorylé de la Polymérase II (PolII-CTD) (Holbert S *et al.*, 2001).
- CtBP, le co-répresseur des protéines polycomb des mammifères et du Facteur d'Elongation EF1- δ (Kegel KB *et al.*, 2002).
- Sp1, caractérisé par un domaine riche en Glutamines, est un facteur de transcription ubiquitaire et il règle l'expression de gènes essentiels ; il recrute le facteur de transcription "TBP Associated Factor 130" ou TAF4 à l'ADN pour activer la transcription de certains gènes. Il interagit avec la HTT sauvage, lorsque cette dernière est exprimée à hauts niveaux, et avec la forme soluble et non la forme agrégée de la HTT mutée (Dunah AW *et al.*, 2002; Li SH *et al.*, 2002) (Fig. 12).

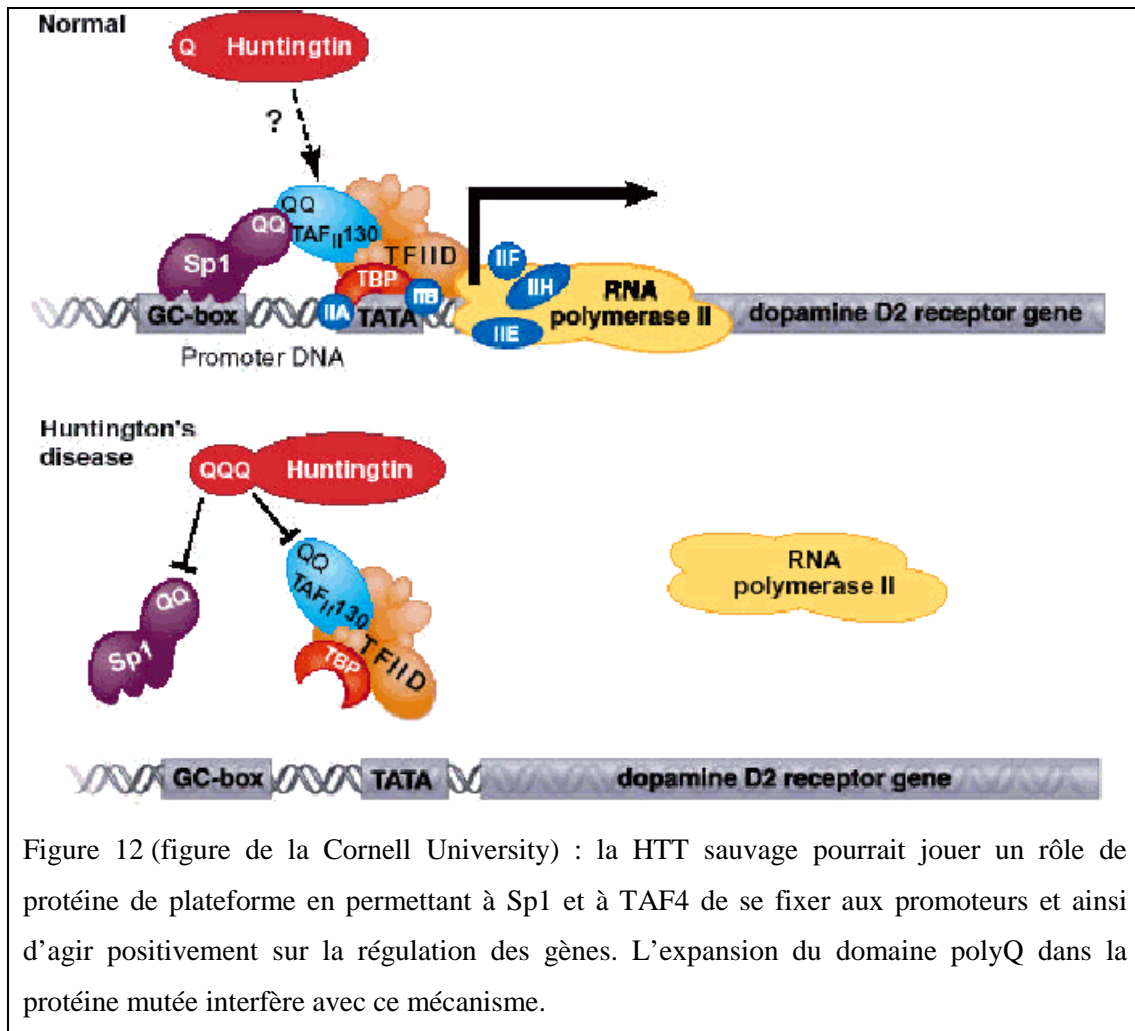


Figure 12 (figure de la Cornell University) : la HTT sauvage pourrait jouer un rôle de protéine de plateforme en permettant à Sp1 et à TAF4 de se fixer aux promoteurs et ainsi d'agir positivement sur la régulation des gènes. L'expansion du domaine polyQ dans la protéine mutée interfère avec ce mécanisme.

- Sin3A, un co-répresseur qui agit en concomitance avec la protéine REST
- La protéine REST/NRSF (Repressor Element 1 – Silencing Transcription Factor / Neuron Restrictive Silencing Factor).

Au cours de la pathogénie de la MH la présence de l'expansion pathologique du domaine polyQ de la HTT comporte l'augmentation de l'affinité de ces liens, conférant des nouvelles propriétés toxiques à la protéine. Ceci se reflète dans la séquestration de ces facteurs au sein des agrégats et dans la dérégulation de leurs fonctions. Ce mécanisme a été avéré pour les facteurs Sp1, p53, TBP, TAF4, CBP (McCampbell A *et al.*, 2000; Steffan JS *et al.*, 2000; Dunah AW *et al.*, 2002; Li SH *et al.*, 2002; Prigge JR and Schmidt EE *et al.*, 2007; Sugars KL and Rubinsztein DC, 2003).

Le résultat de ce changement d'affinité est l'altération de la transcription des gènes réglés en aval de ces facteurs : par ailleurs l'expression des gènes liés à la régulation de la séquence CRE est diminuée dans la MH (Glass M *et al.*, 2000; Nucifora FC *et al.*, 2001; Luthi-Carter R *et al.*, 2002).

HTT et REST

L'interaction de la HTT avec ce facteur de transcription constitue un mécanisme intrigant de régulation de l'expression des gènes. L'altération de ce mécanisme explique plusieurs effets pathogéniques observés au cours de la MH.

REST est un répresseur de la transcription, maître régulateur de gènes neuronaux dans les neurones et dans les cellules non neuronales ; dans une moindre mesure il règle aussi l'expression des gènes non neuronaux. Son action est étroitement liée au contexte cellulaire. REST se lie, par son domaine 'DNA-binding', au motif (21bp) RE1 de l'ADN de gènes cibles. A la suite de ce lien REST recrute, par son domaine N-terminal, le co-répresseur Sin3A et les déacétylases des histones, HDACs (HDAC1 et HDAC2) ; ces dernières inhibent l'expression des gènes enlevant les groupes acétyles des histones. En même temps par son domaine C-Terminal il recrute d'autres facteurs, par exemple CoREST, un corépresseur ; la LSD1, une déméthylase des histones ; la G9a une méthyltransférase des histones et aussi des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine (BAF170, BRAF35 et BRG1). L'ensemble des actions de ces facteurs conduit à la répression de la transcription (revu dans Okazawa H, 2003). La HTT sauvage a la capacité de se lier à REST dans le cytoplasme. Ce lien empêche la translocation de REST au noyau et son interaction avec RE1 (Zuccato C *et al.*, 2003). Par conséquent la transcription des gènes réglés par RE1, tels que celui codant pour le BDNF (pour Brain Derived Neurotrophic Factor), est augmentée. L'interaction entre HTT et REST a lieu *via* ses interactions avec la "HTT Associated Protein 1" (HAP1) et la "Rab Interacting Lysosomal Protein" (RILP) (Shimojo M, 2008).

Au cours de la MH, la HTT mutée a une affinité réduite pour REST, qui est responsable de la répression de la transcription du BDNF (Zuccato C *et al.*, 2003). La diminution de la transcription du BDNF est la conséquence d'une perte de fonction.

L'action de REST sur le recrutement des HDACs comporte donc un effet de la HTT mutée sur le remodelage de la chromatine avec une diminution de l'acétylation et une conformation de la chromatine plus compacte et moins accessible aux facteurs de transcriptions, activateurs ou répresseurs. L'utilisation d'inhibiteurs des HDAC améliore les symptômes moteurs observés dans des modèles de la MH : chez la drosophile (*htt^{ex1p}*) (Steffan JS *et al.*, 2001; Pallos J *et al.*, 2008) et chez les rongeurs (R6/2 et N171-82Q) (Hockly E *et al.*, 2003). L'amélioration du phénotype moteur et la survie prolongée sont associés, au niveau moléculaire, à la reconstitution des normales fonctions de transcription et de transport microtubulaire, en particulier du BDNF (Dompierre JP *et al.*, 2007).

Implication des miRNAs

L'interaction entre la HTT et REST a un effet sur l'expression de plusieurs microARN, miRNAs, spécifiques des neurones (Conaco C *et al.*, 2006).

Les microARN (miRNAs) sont des séquences d'ARN non codant constitués par 19-24 nucléotides qui agissent comme des régulateurs négatifs de l'expression post-transcriptionnelle (Kim VN, 2005). Un seul miRNA peut cibler parallèlement plusieurs ARN messagers et ainsi inhiber l'expression de plusieurs gènes ; par conséquent les miRNAs ont le potentiel de modifier simultanément l'activité de plusieurs voies intracellulaires. Par exemple, en conditions physiologiques mir-124 inhibe l'expression des gènes non neuronaux dans les neurones (Lim LP *et al.*, 2005). Au cours de la MH, la dérégulation des miRNAs réglés par REST a été observée (Soldati C *et al.*, 2013; Das E *et al.*, 2013). Très récemment Luthi-Carther et coll (Jovicic A *et al.*, 2013) ont constaté que la HTT est aussi impliquée dans l'expression de mir-22, qui à son tour cible l'expression des HDACs et du corépresseur de REST RCoR.

HTT et le complexe TORC-CREB

La famille des coactivateurs TORCs (pour Transducers of Regulated CREB Activity) comprend TORC1, TORC2 et TORC3. Il s'agit de coactivateurs de CREB (Conkright MD *et al.*, 2003) qui règlent positivement l'activité du promoteur du PGC-1 α , et par conséquence la transcription et la biogenèse mitochondriale (Wu Z *et al.*, 2006).

Dans le cerveau les niveaux d'expression de TORC1 sont très élevés, en revanche TORC2 et TORC3 abondent dans les poumons et les muscles (Wu Z *et al.*, 2006).

TORC1 a un rôle dans la croissance des neurites pendant le développement des neurones corticaux dans la résistance au stress et dans la survie des neurones après ischémie (Wang B *et al.*, 2008; Hietakangas V and Cohen S, 2008).

Très récemment il a été suggéré que la HTT mutée pourrait interférer avec l'interaction TORC-CREB (Chaturvedi RK *et al.*, 2012) ; ceci représente un mécanisme additionnel de répression sur la transcription du BDNF et de PGC-1 α , un cofacteur de transcription important dans la fonction mitochondriale (pour une revue Chaturvedi RK and Beal MF, 2013).

HTT mutée interfère avec l'expression des récepteurs des neurotransmetteurs

La diminution de l'expression des gènes pour des récepteurs spécifiques des neurotransmetteurs, y compris les récepteurs D1 et D2 de la dopamine et des récepteurs ionotropes et metabotropes du glutamate et du récepteur muscarinique de l'acetylcholine, a été relevée chez les patients MH et dans des modèles de souris (Cha JH *et al.*, 1998; Penney JB and Young AB, 1982; Richfield EK *et al.*, 1991; Faull RL *et al.*, 1993).

IV.3.2 Rôle de la HTT dans la dynamique des vésicules et le transport axonal; interaction avec les protéines HIP et HAP

Les premières études de localisation subcellulaire ont indiqué que la HTT est une protéine cytosolique, associée aux microtubules et aux vésicules synaptiques (Gutekunst CA *et al.*, 1995). Ces observations ont permis d'envisager pour cette protéine une fonction d'ancrage des vésicules, du cytosquelette et dans le transport des mitochondries, ou d'autres organites ou molécules.

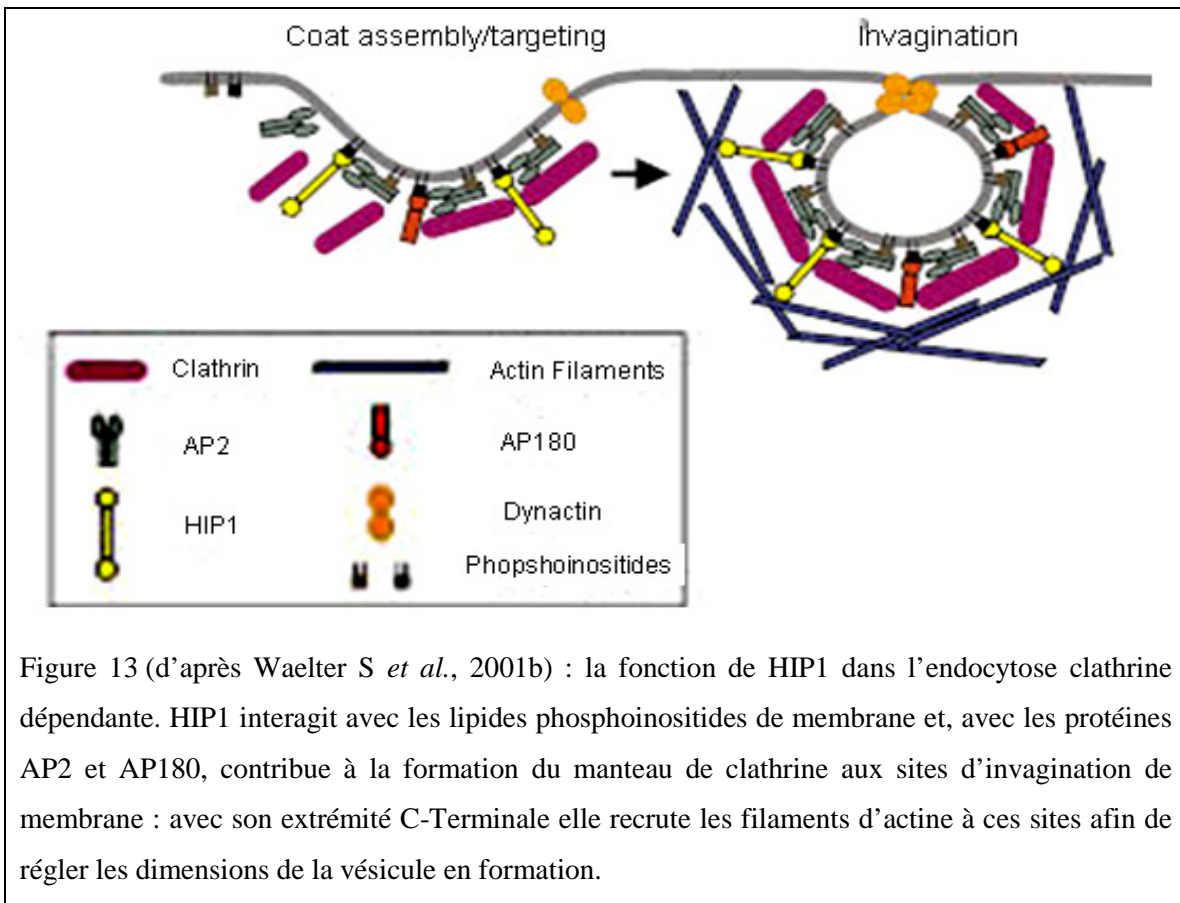
Depuis ces premières observations, de nombreuses études ont confirmé cette hypothèse. La HTT, sauvage et mutée, a été trouvée associée aux membranes des voies de sécrétion et d'endocytose (Velier J *et al.*, 1998).

De fait, la localisation de la protéine correspond en partie aux sites où la clathrine, s'accumule en couches ou en manteau.

Différents types de vésicules proviennent des sites membranaires revêtus par la clathrine: i) celles de la voie sécrétoire du TGN (Trans Golgi Network, TGN), destinées à fournir des protéines aux lysosomes, aux endosomes, et à différents sites le long de la membrane plasmique ; ii) les vésicules pour l'endocytose qui interviennent dans la régulation de l'internalisation des récepteurs induite par un ligand, de la transduction des signaux intracellulaires et, comme les vésicules du TGN, dans le transfert de complexes des protéines aux endosomes précoces (Pearse BM and Robinson MS, 1990).

Dans le processus de l'endocytose la membrane s'invagine tout autour du complexe formé par la clathrine, le récepteur, et la protéine adaptatrice AP2, jusqu'à la fusion et au détachement de la vésicule de la membrane ; la GTPase dynamine intervient dans ces dernières étapes.

L'interaction entre la HTT et la protéine HIP (pour Huntingtin Intracating Protein) est importante pour comprendre le rôle de ces protéines dans le trafic vésiculaire. La protéine HIP lie directement la clathrine et une sous-unité du complexe adaptateur de la clathrine AP2, la α -adaptine (Metzler M *et al.*, 2001; Waelter S *et al.*, 2001b), une protéine directement impliquée dans la régulation de l'internalisation des récepteurs (Legendre-Guillemin V *et al.*, 2005), de plus son absence détermine l'apparition d'un syndrome neurologique dans les modèles murins (Metzler M *et al.*, 2001; Hyun TS *et al.*, 2004).



Dans les neurones tous les compartiments subcellulaires – y compris organelles, et protéines du cytosquelette – sont transportés le long des prolongements.

Le transport axonal d'un cargo spécifique peut être bidirectionnel, antérograde et rétrograde, ou unidirectionnel ; encore on peut distinguer un transport lent et un transport rapide. Par exemple les structures membraneuses, organelles, vésicules synaptiques et endosomes, sont transportées dans les deux directions le long des microtubules (MTS pour Micro Tubular System) de façon rapide ; par contre les protéines du cytosquelette, actine, tubuline et neurofilaments, sont transportées par le transport axonal lent. Ainsi le transport axonal rapide est assuré i) par la kinésine lorsqu'il est antérograde, vers les terminaisons axonales ; ii) par la dynéine, dans le cas du transport rétrograde vers le corps cellulaire neuronal.

In vivo le transport bidirectionnel des vésicules doit être coordonné, la dynactine étant une protéine coordinatrice ; en particulier, la sous-unité p150^{glued} de la dynactine est très

importante dans la médiation de l'attachement des cargos aux protéines motrices kinésine et chaînes intermédiaires de la dynéine (DIC, pour Dynein Intermediate Chain).

Certains cargos, comme les récepteurs, se localisent aux terminaisons axonales par le transport antérograde et peuvent être ensuite internalisés et transportés à l'arrière dans les corps neuronaux, par la voie de l'endocytose et du transport rétrograde, pour être recyclés. Ce mécanisme est déterminant vis-à-vis de leur régulation.

Des endosomes de tailles différentes, en particulier les organites multivésiculés (Multivesicular bodies, MVBs), prennent part au transport rétrograde.

Le transport rétrograde sert aussi à transporter dans le corps cellulaire certaines protéines qui y sont dégradées. D'autres protéines, par exemple celles associées aux vésicules, sont transportées et dégradées aux terminaisons des axones ; c'est le cas par exemple de protéines SNAP-25 et Rab3A (Walch-Solimena C *et al.*, 1995; Li JY *et al.*, 1995 and 1996).

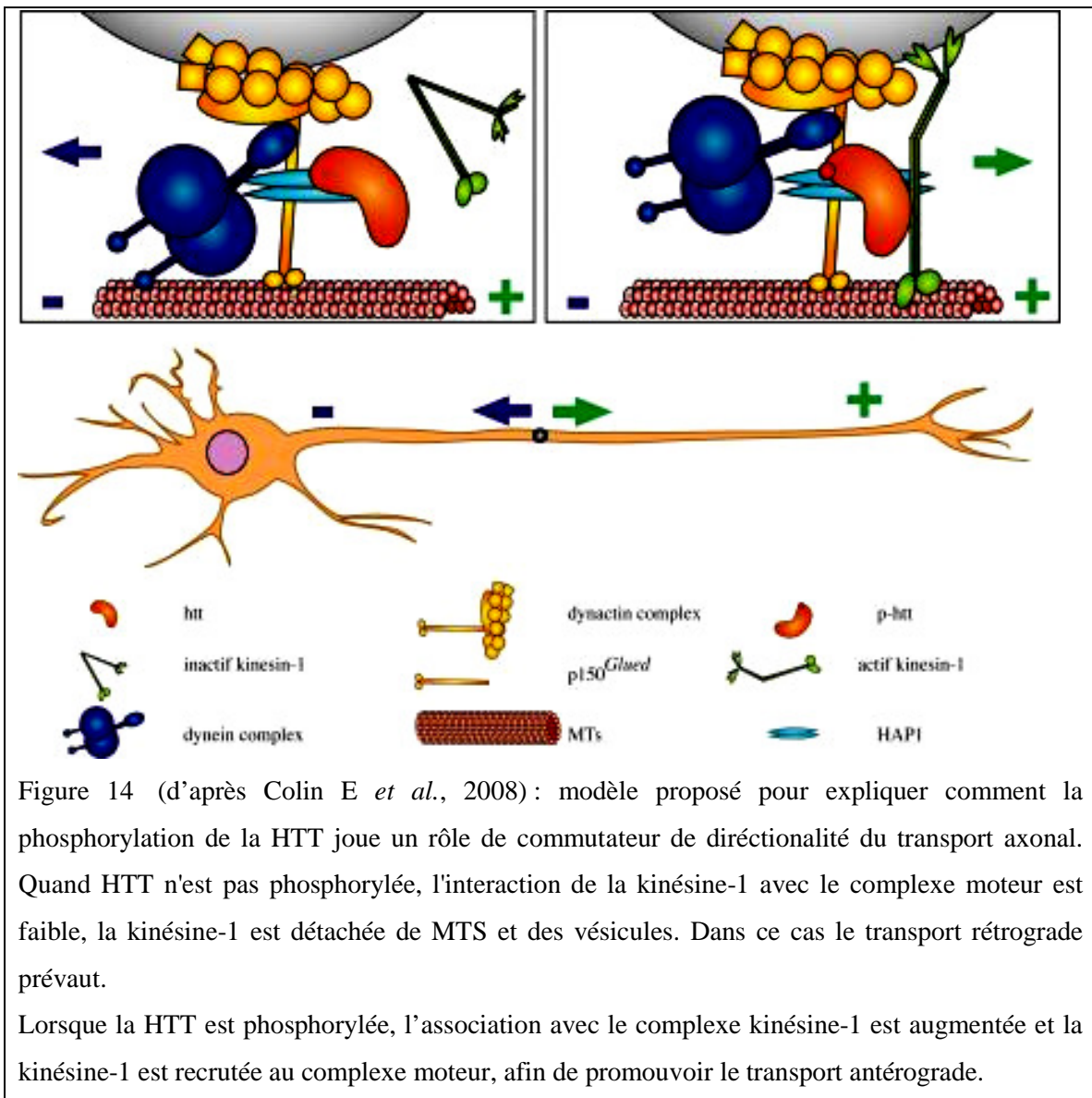
Par son domaine HEAT, la HTT interagit, au niveau de l'axone, avec la Protéine Associée à l'Huntingtine 1 (Huntingtin Associated Protein 1, HAP 1). Similairement à la HTT, la protéine HAP 1 est soupçonnée avoir un rôle dans la dynamique de recyclage des récepteurs et dans le trafic des vésicules (Li XJ *et al.*, 1995; Jacob TC *et al.*, 2008). HAP1 interagit avec la dynéine/dynactine (Engelender S *et al.*, 1997; Block-Galarza J *et al.*, 1997) et avec la kinésine (McGuire JR *et al.*, 2006) et serait le médiateur des interactions entre la HTT et ces protéines. Néanmoins, dans le cadre du transport rétrograde, l'interaction entre la HTT et la dynéine est aussi directe (Caviston JP *et al.*, 2007).

La formation d'un complexe macromoléculaire formé par HTT, les protéines HAP1, dynéine/dynactine, la kinésine, les microtubules et la HTT est considérée essentielle à l'efficacité du transport vésiculaire antérograde et rétrograde ; en particulier ce mécanisme joue un rôle de premier plan vis-à-vis de la régulation de la sécrétion du BDNF (Gauthier LR *et al.*, 2004).

La HTT serait dans ce complexe la protéine d'échafaudage pour recruter et positionner les vésicules endosomales à la machinerie du transport axonal (Caviston JP *et al.*, 2007; Caviston JP *et al.*, 2011).

Egalement, HTT et HAP interagissent avec d'autres protéines impliquées dans le trafic vésiculaire comme Rab5 (Pal A *et al.*, 2006), une petite GTPase impliquée dans le trafic des récepteurs Trk dans les endosomes précoces (Deinhardt K *et al.*, 2006) et dans la régulation du transport rétrograde des vésicules TrkB-positives contenant le BDNF (Liot G *et al.*, 2013).

Il a été prouvé que l'effet de la HTT sur le transport axonal antérograde dépend de la phosphorylation de la HTT sur le résidu Ser 421. La phosphorylation de ce résidu déterminerait le recrutement de la kinésine dans le complexe dynactine-microtubules et la directionnalité du transport (Colin E *et al.*, 2008; Zala D *et al.*, 2008) (Fig. 14).



HTT interagit aussi avec l'optinéurine (del Toro D *et al.*, 2009), une protéine appartenant à la machinerie du transport antérograde lent dépendant de l'actine (Sahlender DA *et al.*, 2005). Ces deux dernières observations ont conduit à envisager pour la HTT un rôle de commutateur moléculaire pour modifier l'affinité des cargos à la machinerie du transport axonal et déterminer la directionnalité.

IV.3.3 Rôle dans l'embryogenèse et la neurogénèse

L'association de la HTT au réseau microtubulaire par sa liaison à la dynéine et à la sous-unité p150^{glued} de la dynactine (Caviston JP *et al.*, 2007; Caviston JP *et al.*, 2011) explique aussi le rôle de la HTT dans l'embryogenèse et la neurogénèse.

La HTT se retrouve enrichie aux pôles du fuseau mitotique en association avec d'autres protéines mitotiques nucléaires, telles que NuMA (pour Nuclear Mitotic Apparatus Protein), acteurs essentiels pour l'organisation des microtubules (Radulescu AE and Cleveland DW, 2010).

En absence de HTT toutes ces protéines, dynéine, p150^{glued} et NuMA sont dispersées. (Godin JD *et al.*, 2010; Godin JD and Humbert S, 2011).

Effectivement la HTT est indispensable pendant la phase précoce de l'embryogenèse. La délétion de la HTT dans les souris (hdh^{-/-}) a pour conséquence une létalité *in utero* entre E8.5-E10.5 (Nasir J *et al.*, 1995). A E6.5 les embryons de ces souris ne présentent pas de différence avec des embryons de souris WT du même âge. A E7.5 ils présentent une désorganisation cellulaire, et une augmentation des phénomènes d'apoptose (Zeitlin S *et al.*, 1995). L'injection de cellules souches dans les embryons hdh^{-/-} au stade de blastocyste (E4) permet un normal développement (Dragatsis I *et al.*, 1998).

La HTT a aussi un rôle dans la neurogénèse. Les neurones corticaux naissent à partir de cellules souches qui se divisent de manière symétrique pour s'auto-renouveler et engendrer deux cellules souches, ou asymétrique, pour produire une cellule souche et un neurone qui intégrera le futur cortex (Siller KH and Doe QC, 2009; Knoblich JA, 2008). L'orientation du fuseau joue un rôle dans la détermination du type de division. L'absence de HTT favoriserait la division asymétrique et la différenciation des progéniteurs au détriment de leur prolifération (Godin JD *et al.*, 2010).

IV.3.4 Rôle anti-apoptotique et pro-survie

L'apoptose est le mécanisme de mort cellulaire programmée ; elle est caractérisée par la condensation de la chromatine dans le noyau, la contraction du volume de la cellule, le renflement irrégulier de la membrane cellulaire, et la fragmentation de l'ADN.

L'apoptose est déclenchée en réponse à différents signaux apoptotiques (phase 1) tels que la stimulation d'un récepteur de surface, la suppression des facteurs de croissance indispensables, ou l'exposition à divers agents chimiques, à des rayonnements ionisants ou UV, la chaleur, ou tous changements de l'osmolarité ; la cellule engage alors plusieurs voies de transduction de signal (phase 2) : comme l'activation (ou inactivation) de kinases (serine- , threonine- et tyrosine- kinases), et phosphatases, et la synthèse des seconds messagers lipidiques, comme la céramide, la modification de l'expression de certains gènes, et l'activation de protéases spécialisées appelées caspases. Dans la phase finale (phase 3) - selon les niveaux relatifs des facteurs apoptotiques et de survie (comprenant la protéine p53 et les membres de la famille Bcl-2), ainsi que l'état métabolique de la cellule, y compris la bioénergétique mitochondriale - le programme de mort cellulaire est déclenché et la cellule assume les caractéristiques morphologiques typiques.

Les caspases sont fondamentales pour la régulation de l'apoptose. Un lien étroit existe entre l'activation des caspases initiatrices (2, 8, 9, 10, 11, et 12) et les signaux pro-apoptotiques. Une fois activées, les caspases initiatrices clivent et activent les caspases effectrices en aval (3, 6, 7), qui à leur tour exécutent l'apoptose par clivage de protéines.

L'activation de Fas par FasL (ligand de Fas) et de TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) par TNF, conduit à l'activation des caspases 8 et 10. Des lésions de l'ADN induisent l'activation de la caspase 2.

Au niveau de la mitochondrie, le cytochrome c libérés des mitochondries endommagées est couplé à l'activation de la caspase 9.

Plusieurs protéines pro-apoptotiques sont libérées de l'espace inter-membranaire en plus du cytochrome c : Smac / Diablo, AIF, HtrA2 et EndoG.

Smac / Diablo se lie à la protéine XIAP ; ceci est une protéine anti-apoptotique qui inhibe l'activation des caspases 3, 7 et 9. Le lien de Smac/Diablo à XIAP empêche l'inhibition des caspases.

La caspase 11 est induite par des stimuli pro-inflammatoires et pro-apoptotiques pathologiques et entraîne l'activation de la caspase 1, favorisant ainsi la réponse inflammatoire et l'apoptose par activation de la caspase 3.

Les caspases 12 et 7 sont activées dans des conditions de stress du réticulum endoplasmique. Certains de ces mécanismes sont résumés dans la figure 15.

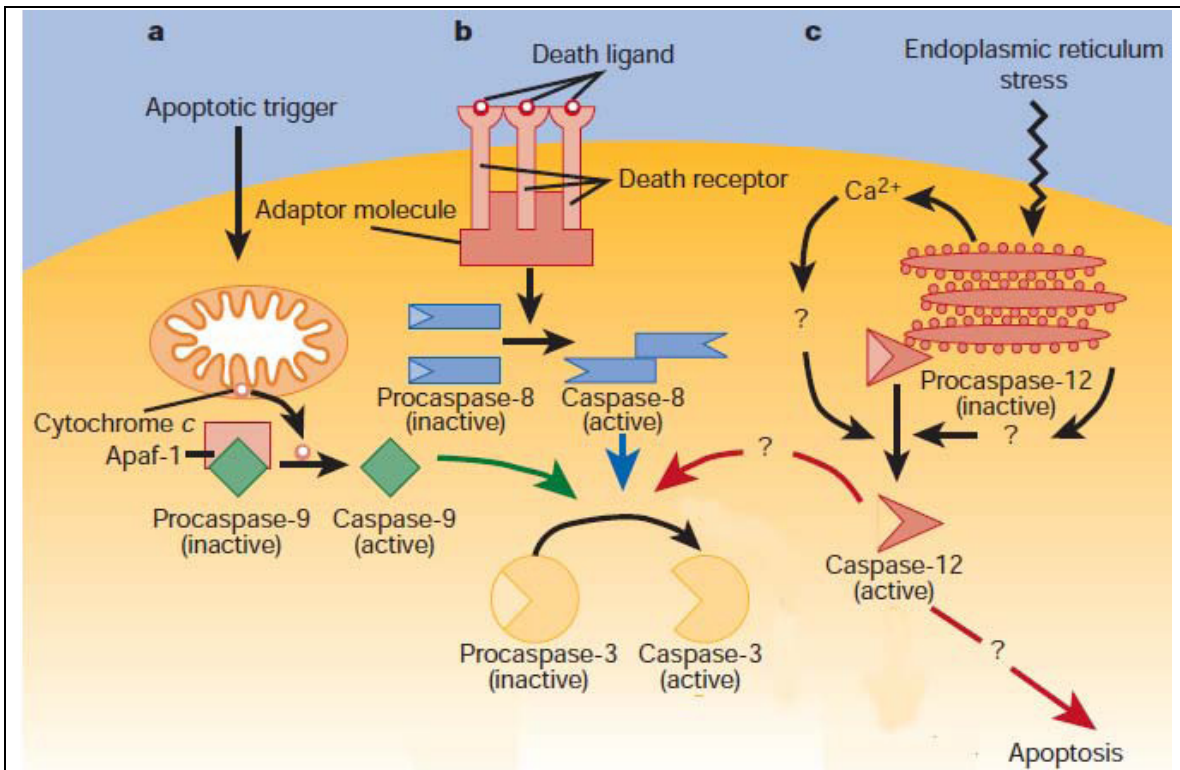


Figure 15 (d'après Mehmet H, 2000) : représentation schématique de l'apoptose. Il existe 3 voies de signalisation conduisant à l'apoptose. (a) Quand la mitochondrie reçoit des stimuli apoptotiques, des molécules comme le cytochrome c sont libérées dans le cytosol. Le cytochrome c forme un complexe avec Apaf-1 afin de cliver la procaspase 9 en une caspase 9 active. (b) L'oligomérisation des récepteurs de « mort » permet le recrutement de molécules adaptatrices impliquées dans l'activation de la caspase 8. La caspase 8 active est le résultat de la dimérisation des procaspases 8. (c) Un stress au RE permet la libération de Ca^{2+} et active la caspase 12. Les caspases initiatrices (9, 8,12) permettent l'activation des caspases exécutrices comme la caspase3.

La famille des facteurs de transcription Forkhead of Transcription O (FoxO) favorise l'apoptose par régulation positive de molécules pro-apoptotiques telles que FasL et Bim. En revanche, l'activation de Akt, par action des ligands anti-apoptotiques, y compris les

facteurs de croissance et les cytokines, est responsable de la phosphorylation et de l'inhibition des facteurs FoxO et empêche l'activation de Bim.

La HTT sauvage présente dans sa structure des sites de clivage pour les caspases. Ces sites sont importants dans le mécanisme de formation des agrégats, lorsque le domaine polyQ est sujet à expansions pathologiques. De même, ils témoignent que le rôle de la HTT est physiologiquement imbriqué avec les mécanismes qui règlent la survie cellulaire.

Les travaux cités dans le paragraphe concernant le rôle de la HTT pendant l'embryogenèse démontrent qu'au cours du développement l'inactivation du gène de la HTT provoque l'augmentation de la mort cellulaire programmée chez la souris (Zeitlin S *et al.*, 1995; Dragatsis I *et al.*, 1998).

Le rôle anti-apoptotique de la HTT pourrait être expliqué par plusieurs mécanismes :

- i) la HTT règle la transcription dans les neurones corticaux (Zuccato C *et al.*, 2001 et 2003) et le transport au striatum par la voie cortico-striée (Gauthier LR *et al.*, 2004) du facteur de croissance BDNF, essentiel pour la maintenance des neurones.
- ii) La HTT interagit avec HIP1, une protéine contenant un domaine 'death effector'; lorsque que l'interaction entre HTT et HIP1 est déficitaire, HIP1 interagit avec un partenaire alternatif Hip1 déclenchant un mécanisme apoptotique dépendant de l'activation de la caspase 8 (Gervais FG *et al.*, 2002).
- iii) Par interaction avec la protéine synaptique PSD-95, HTT règle la neurotransmission au niveau post-synaptique, par exemple déterminant la densité des récepteurs NMDARs et par conséquent les niveaux d'excitabilité neuronale, l'entrée du Ca^{2+} , l'excitotoxicité et en fin la mort neuronale.
- iv) Enfin la HTT est le substrat d'Akt (serine/thréonine kinase) et de la "Serum and Glucocorticoid-induced Kinase" (SGK). Akt et SGK sont des acteurs majeurs dans les voies de signalisation pro-survie (Colin E *et al.*, 2005; Rangone H *et al.*, 2004).

IV.4 La HTT mutée. Propriétés et mécanismes pathogéniques additionnels

IV.4.1 Le clivage de la HTT mutée

L'expansion du domaine polyQ modifie la protéolyse de la HTT mutée. Ainsi le clivage de la protéine mutée par l'action de plusieurs protéases engendre des fragments de différentes tailles, qui ont été caractérisés dans les extraits *post mortem* des patients MH ainsi que dans les tissus animaux et les modèles cellulaires.

Une étude attentive faite par Hermel en 2004 permet une reconstruction dynamique des événements de clivage. *In vivo* ils montrent qu'initialement la caspase 2 lie directement la HTT mutée entière, avec affinité proportionnelle à la longueur du domaine polyQ et spécifiquement dans les régions affectées. Les niveaux d'expression et l'activité de cette caspase, tout comme ceux des autres caspases qui agissent en aval, sont plus hauts dans les régions et dans les populations neuronales affectées au cours de la MH. De plus les niveaux de la caspase 2 seraient inversement corrélés à ceux du BDNF. La caspase 7, enrichie dans les MSNs, serait aussi capable de se lier à la forme entière de la HTT mutée. L'action combinée de ces 2 premières caspases avec celles qui agissent en aval, rend le processus de clivage plus efficient (Hermel E *et al.*, 2004).

L'invalidation des sites de clivage des 5 caspases (caspases 1, 3, 6, 7, 8) sur la HTT mutée diminue la mortalité cellulaire observée *in vitro* (Wellington CL *et al.*, 2000; Graham RK *et al.*, 2006).

Outre que par les caspases, la HTT mutée subit le clivage des calpaïnes et des metalloprotéases.

Les calpaïnes sont des cystéines protéases dépendantes du Ca^{2+} , abondant dans les neurones. Les calpaïnes μ et m peuvent cliver la HTT mutée (Kim YJ *et al.*, 2001) aux résidus 469 et 536 (Gafni J *et al.*, 2004) ; la calpaïne μ engendre les fragments les plus petits (40-60kda) (Mende-Mueller LM *et al.*, 2001). L'expression de la calpaïne μ est induite fortement dans les souris transgéniques exprimant la forme entière de la HTT mutée (YAC128) (Cowan CM *et al.*, 2008) et dans le noyau caudé des patients (Gafni J and Ellerby LM, 2002). L'activation de la calpaïne μ est augmentée en réponse à

l'injection intrastriatale de l'acide 3 nitropropionique (3NP) chez les rats ; cette augmentation est corrélée à la toxicité cellulaire et son inhibition pharmacologique a un effet neuroprotecteur (Bizat N *et al.*, 2003).

Les métalloprotéases de la matrice (MMP) sont des endopeptidases dépendantes du zinc. La HTT mutée est clivée par la MMP-10 en position 402. Le niveau de MMP-10 active est fortement accru chez les souris exprimant la forme entière ou le fragment N-Terminal de la HTT mutée (YAC128, R6/2) (Miller JP *et al.*, 2010). L'inhibition de MMP-10 diminue la mort neuronale dans la lignée murine Hdh111Q/111Q et diminue les déficits moteurs dans les modèles de drosophile exprimant le fragment HTT 336-128Q (Miller JP *et al.*, 2010).

Des fragments de la HTT mutée observés dans des lignées cellulaires exprimant la HTT mutée, ne correspondent pas à l'action de protéases connues. C'est le cas des fragments « cp-a » et « cp-b » générés par la coupure de la HTT respectivement entre les acides aminés 104 -144 et les acides aminés 146 -214 (Lunkes A *et al.*, 2002).

Les mécanismes par lesquels la HTT mutée clivée nuirait à la viabilité de la cellule restent mal compris. Les fragments N-terminaux de la HTT mutée sont plus toxiques que la forme entière (DiFiglia M *et al.*, 1997; Lunkes A and Mandel JL, 1998; Saudou F *et al.*, 1998; Li H *et al.*, 2000). Une possible explication à cette toxicité accrue consiste dans le fait qu'ils peuvent facilement transloquer dans le noyau.

La translocation des fragments de la HTT mutée est réglée par le niveau de leur phosphorylation. La phosphorylation de la protéine sur les sérines 13 et 16 augmente sa localisation au noyau (Gu X *et al.*, 2009; Havel LS *et al.*, 2011). De plus, la phosphorylation sur la sérine 16 inhibe l'export de la protéine du noyau au cytoplasme, inhibant l'interaction de la HTT mutée avec la protéine TPR, une protéine du pore nucléaire (Cornett J *et al.*, 2005). La coexistence de ces deux phénomènes permettrait l'accumulation des fragments N-terminaux de la HTT mutée au noyau, une étape clé pour la mort neuronale dans la MH (Saudou F *et al.*, 1998).

IV.4.2 Formation des agrégats

Les agrégats ont été mis en évidence par l'immunoréaction contre l'ubiquitine et la HTT mutée dans l'étude des modèles murins transgéniques de MH (Mangiarini L *et al.*, 1996; Davies SW *et al.*, 1997) et dans l'étude *post-mortem* des cerveaux de patients (DiFiglia M *et al.*, 1997). Leur rôle dans la pathogénie de la MH est toujours discuté mais ils restent une signature pathologique de la maladie.

Ils sont constitués des fragments N-terminaux dérivant de la protéolyse de la HTT mutée. Ils contiennent un grand nombre d'autres protéines, en particulier l'ubiquitine, les sous-unités 20S, 19S, et 11S du protéasome 26S, la protéine GRP78, un chaperon du réticulum endoplasmique qui se retrouve normalement associé aux protéines mal repliées ou partiellement assemblées afin de les cibler pour la protéolyse (Voges D *et al.*, 1999), les chaperons Hsp70, et Hsp40, le chaperon potentiel 14-3-3, une protéine qui lie l'ARN et l' α -synucléine (Waelter S *et al.*, 2001b). Leur immunoréactivité pour la γ -tubuline, un marqueur du centrosome et la stricte association aux filaments de vimentine, qui se répartissent autour des agrégats en formant des structures à anneaux, indiquent qu'ils ont une structure similaire à celle de centrosomes (Waelter S *et al.*, 2001a). Leur formation peut être inhibée par la surexpression des protéines chaperonnes Hsp40 et Hsp70 (Muchowsky PJ *et al.*, 2000)

En ce qui concerne le mécanisme de formation des agrégats, le domaine NT17 de la HTT mutée et le domaine polyQ peuvent interagir entre eux, accélérant l'agrégation (Thakur AK *et al.*, 2009). Les fragments de la HTT contenant l'expansion pathologique du domaine polyQ adoptent une structure β pour créer des formes globulaires (Poirier MA *et al.*, 2002). Ces feuilletts β peuvent être anti-parallèles (« polar zipper ») (Perutz MF, 1995), ou parallèles et former des structures en épingles à cheveux (« hairpin »). L'assemblage de plusieurs monomères β détermine la formation d'une unité protofibrillaire, dégradable par l'utilisation de détergents comme le SDS. Une fibre mature peut ainsi résulter de 2 protofibrilles ou 1 protofibrille combinées avec des oligomères. Les fibres matures créent un agrégat insoluble.

Les agrégats sont présents dans l'ensemble de la cellule : le cytoplasme, le noyau (inclusions intranucléaires, NII) et dans les prolongements des neurones. L'apparition des agrégats dépend du nombre de répétitions dans le domaine polyQ (Scherzinger E *et al.*, 1997; Martindale D *et al.*, 1998; Li H *et al.*, 1999).

Le nombre des agrégats augmente avec la progression de la maladie, mais leur rôle dans la pathogénie de la MH est toujours discuté.

Il n'existe pas de corrélation entre les NII et la mort neuronale. Les régions contenant le plus de cellules avec des NII sont celles qui ne dégèrent pas (Gutekunst CA *et al.*, 1999). *In vitro*, la présence des agrégats dans les neurones corrèle positivement avec leur survie (Arrasate M *et al.*, 2004; Saudou F *et al.*, 1998).

Les études *post mortem* effectuées sur les tissus des patients atteints de MH à tous les stades ont démontré que contrairement aux inclusions intranucléaires, la présence d'agrégats au niveau des néuropiles dans le cortex cérébral et dans le striatum est corrélée avec la neuropathologie (Gutekunst CA *et al.*, 1999). Au cours de stades précoces de la maladie les neurites se montrent dystrophiques avant la mort cellulaire (DiFiglia M *et al.*, 1997; Sapp E *et al.*, 1999). La présence d'agrégats dans les neurites a suggéré qu'ils pourraient provoquer leur dégénérescence, probablement par le dérèglement de la fonction synaptique (Li H *et al.*, 2000).

On a vu, dans un paragraphe précédant que les facteurs de transcriptions, mais aussi les protéines chaperonnes et les protéines impliquées dans le transport peuvent être piégées par la HTT mutée au cours de la formation des agrégats. Les inclusions sont aussi ubiquitylées, impliquant l'activation du système ubiquitine-protéasome (UPS).

L'inhibition de la formation des agrégats par le tréhalose, un disaccharide, permet une amélioration du phénotype moteur chez les souris R6/2 (Tanaka M *et al.*, 2004).

Un rôle des transglutaminases (TGs) dans la stabilisation des agrégats a été proposé.

Les TGs réalisent la transamination, l'incorporation de polyamine et la désamination de glutamines sur les séquences polyQ. L'expression de la TG2 est fortement augmentée dans le cerveau de patient (Lesort M *et al.*, 2000; Karpuj MV *et al.*, 2002a). La TG2

serait présente dans les inclusions intranucléaires (Zainelli GM *et al.*, 2003) et son inhibition par la cystéamine diminue le nombre de NII et améliore le phénotype de la maladie (Van Raamsdonk JM *et al.*, 2005; Karpuj MV *et al.*, 2002b).

Toutefois l'expérimentation *in vitro* d'autres traitements anti-agrégants a produit des résultats controversés (Sanchez I *et al.*, 2003; Wood NI *et al.*, 2007).

IV.4.3 Dérégulation du Système Ubiquitine-Protéasome au cours de la MH

Dans la cellule les protéines mal repliées, comme c'est le cas des feuilletts β de la HTT mutée, sont pour la plupart reconnues sur la base de leurs sites hydrophobes accessibles aux chaperons et, lorsqu'il est impossible de les replier à leur état naturel, elles sont adressées pour la protéolyse. Les voies les plus importantes pour éliminer les protéines mal repliées de l'environnement cellulaire sont les systèmes ubiquitine-protéasome, UPS, et l'autophagie.

Une description détaillée du fonctionnement de l'UPS est faite au cours de la section concernant la Maladie de Parkinson et la Parkine, une E3 ubiquitine-protéine ligase impliquée dans cette maladie.

La dysfonction de l'UPS est soupçonnée d'être impliquée dans toutes les maladies à expansion de polyQ. En effet les agrégats intracellulaires qui se retrouvent dans ces maladies sont immunoréactifs à l'ubiquitine, Ub (Davies SW *et al.*, 1997; DiFiglia M *et al.*, 1997). Il a été soupçonné que, soit à cause de sa résistance à la dégradation, soit parce qu'il entraîne la formation d'agrégats piégeant les composants de l'UPS, l'expansion du domaine polyQ pourrait bloquer et/ou saturer l'UPS.

Au sujet de la dégradation du domaine polyQ des résultats discordants ont été publiés : le domaine polyQ pourrait être résistant au clivage (Venkatraman P *et al.*, 2004) ou complètement dégradé à la suite de clivages réguliers (toutes les 10 glutamines) (Pratt G and Rechsteiner M, 2008).

En ce qui concerne la saturation de l'UPS, en effet - l'expansion du domaine polyQ lui conférant de nouvelles propriétés toxiques - la HTT mutée et mal repliée utiliserait le stock d'ubiquitine libre et des protéines chaperonnes, provoquant l'inhibition de ce système (Bence NF *et al.*, 2001; Bett JS *et al.*, 2009).

L'activité de l'UPS est diminuée dans plusieurs régions du cerveau (cervelet, cortex, SN, noyaux caudé et putamen) et dans les fibroblastes de patients atteints de MH (Seo H *et al.*, 2004) à tous les stades.

Dans les modèles animaux, des changements dans la polyubiquitylation ont été observés dans les cerveaux entiers de souris MH (Bennett EJ *et al.*, 2007) et l'activité synaptique de l'UPS a été trouvée significativement diminuée *in vitro* et *in vivo* (Wang J *et al.*, 2008).

D'autre part *in vitro*, si l'inhibition du protéasome augmente la formation des agrégats contenant la HTT mutée et l'Ub (Waelter S *et al.*, 2001a), son activation protège de l'excitotoxicité glutamatergique (Seo H *et al.*, 2007).

IV.4.4 La HTT mutée et l'autophagie

L'autophagie est normalement activée afin d'éliminer les protéines endommagées, lorsque celles-ci excèdent la dimension du petit pore du protéasome (pour les grandes protéines ou les complexes multiprotéiques), ou les composantes cellulaires endommagées de la cellule (mitochondries et péroxysomes). L'autophagie implique la formation d'une structure à double membrane, l'autophagophore, dont l'origine est encore obscure mais implique potentiellement l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et/ou la mitochondrie.

En s'allongeant l'autophagophore englobe les cibles de la dégradation dans la structure à double membrane, on parle alors d'autophagosome. Ce dernier peut fusionner avec les lysosomes ; les hydrolases acides des lysosomes dégradent le contenu de l'autophagosome.

L'autophagophore suit des étapes successives de maturation qui ont été bien décrites chez la levure : a) son initiation, en réponse à une variété de stimuli, comme la privation de nutriments ou l'inhibition de mTOR (pour mammalian Target Of Rapamycin, cible de la rapamycine des mammifères), par la rapamycine, implique l'activation des complexes ULK1 et 2, normalement inhibés par mTOR; b) pendant la nucléation, la Becline-1 et les protéines Vps (Vacuolar Protein Sorting) Vps34 et Vps15, se localisent sur le site à double membrane où naît l'autophagophore.

Successivement pendant c) l'élongation, les protéines du groupe des Atgs, avec des caractéristiques similaires aux protéines conjuguatrices de l'ubiquitine E2, sont recrutées sur l'autophagophore en phase de transformation.

La Becline-1 est jugée indispensable pour l'autophagie. Toutefois, l'existence d'une voie autophagique alternative Becline-1 indépendante est questionnée (Scarlati F *et al.*, 2008).

De façon analogue, chez les mammifères la Becline-1 s'associe à une structure pre-autophagosomale (PAS, Pre Autophagosomal Structures) avec Vps34 et Vps15, pour former la structure 'core' de l'autophagophore.

De nombreuses protéines prennent part à la formation et à la maturation de l'autophagosome chez les mammifères, par exemple la Atg14L, une protéine localisée au réticulum endoplasmique, et d'autres protéines avec les fonctions les plus variées, comme des protéines anti-tumorales (à l'image de UVRAG) ou, comme la protéine AMBRA, ayant un rôle dans développement et dans le transport neuronal, dans la dynamique des membranes (Bif, Bax Interacting Factor), ou dans le système de défense contre le stress oxydant (PINK1). Celles-ci interagissent plutôt avec Beclin-1 et non directement avec l'autophagophore (revu dans Kang R *et al.*, 2011).

Chez les mammifères la protéine Chaîne Légère 3 de la protéine associée aux microtubules, LC3 (Microtubules Associated Protein, Light Chain 3), l'orthologue mammifère de l'Atg8p de levure, se retrouve directement associée aux membranes de l'autophagosome. Suite à l'induction de l'autophagie, la forme cytosolique, LC3-I, se conjugue avec la phosphatidyléthanolamine formant la LC3-II et est recrutée à l'autophagosome (Kabeya Y *et al.*, 2000).

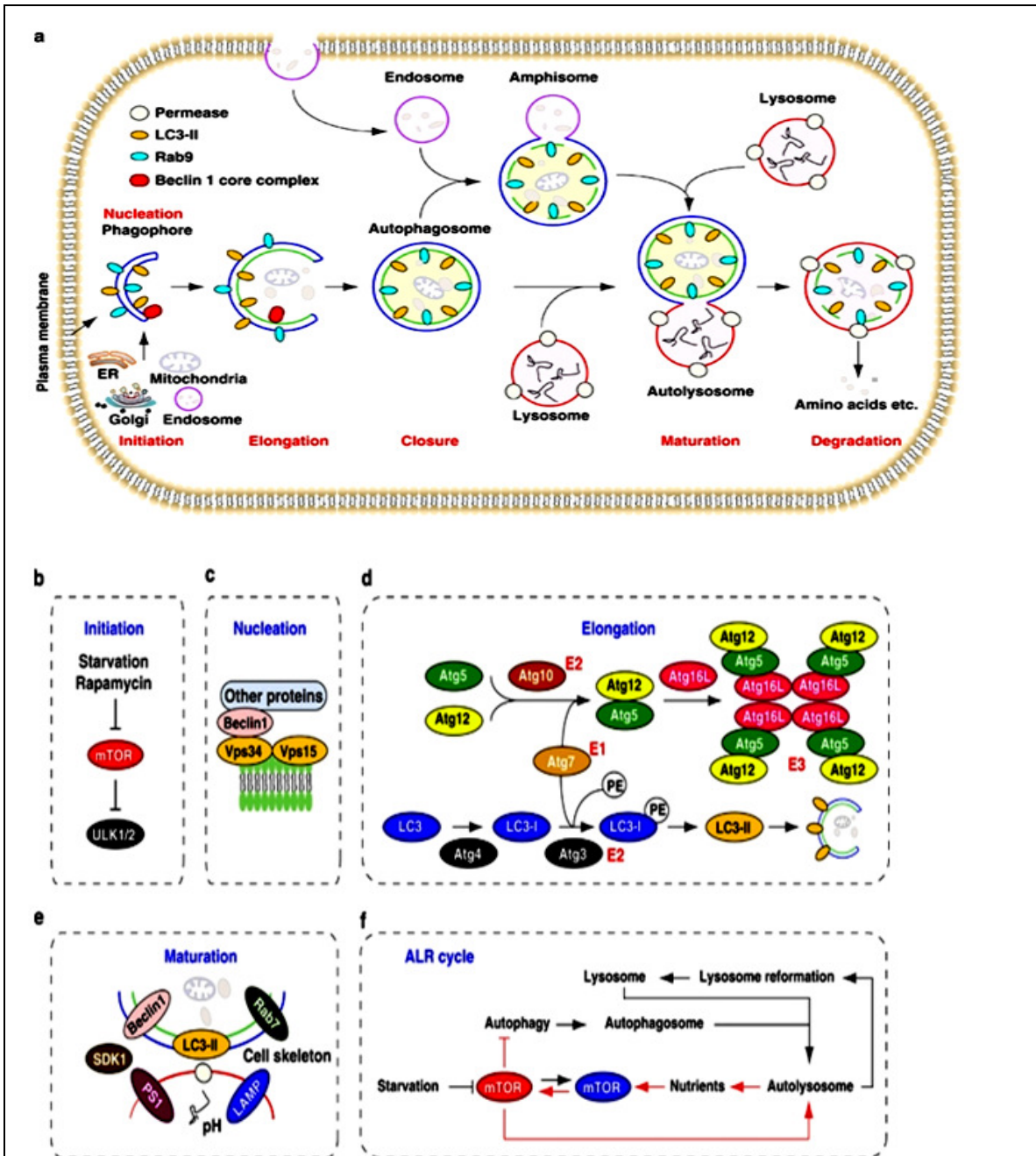


Figure 16 (d'après Kang R *et al.*, 2011) : **(a)** Les différents stades de l'autophagie. LC3-II et Rab-9 sont des marqueurs de l'autophagie dépendante de Atg5/Atg7. **(b)** L'initiation est soutenue par l'activation des complexes ULK1 et ULK2, normalement inhibés par mTOR. **(c)** La nucléation dépend des complexes formés par Becline1-Vps34-Vps15 et autres protéines. **(d)** L'élongation du phagophore est mediée par deux systèmes de conjugaison 'ubiquitin-like' qui ensemble promeuvent l'assemblage du complexe ATG16L et la modification de LC3. PE, phosphatidylethanolamine. **(e)** La maturation est promue par LC3, Becline 1, les protéines

associées aux membranes lysosomales LAMP-1 et -2 (pour Lysosome Associated Membrane Protein 1 and 2), la protéine liante le GTP RAB7, la ATPase SKD1, le squelette cellulaire, le pH des lysosomes est possiblement la preseniline 1 (PS1). (f) Le cycle de reformation lysosome autophagique (ALR, pour Autophagic Lysosome Reformation). La voie de signalisation mTOR est inhibée pendant l'initiation de l'autophagie, mais réactivée par la privation des nutriments prolongée. La réactivation de mTOR dépend de l'autophagie et de la dégradation des produits autolysosomaux. L'augmentation de l'activité de mTOR modère le flux autophagique et engendre des tubules proto-lysosomaux et des vésicules qui sont expulsées des autolysosomes pour enfin mûrir en lysosomes fonctionnels, pour le renouvellement du pool des lysosomes dans la cellule.

Le fait que le Lithium et la rapamycine ont un effet additif sur l'induction de l'autophagie, a mené à la découverte d'une voie mTOR-indépendante, pour l'induction de l'autophagie. Le lithium provoque l'inhibition l'Inosotole Monophosphatase (IMPase) qui à son tour provoque la diminution de l'Inosotole 3 Phosphate (IP3) (Sarkar S *et al.*, 2005).

La dysfonction de l'autophagie (dépendante ou indépendante de mTOR) a été mise en cause dans la pathogénie de plusieurs maladies neurodégénératives associées à la formation d'inclusions intracellulaires comme la MH, la MP, la Sclérose Latérale Amyotrophique, les ataxies spinocérébelleuses (SCAs) (Berger Z *et al.*, 2006; Ravikumar B *et al.*, 2002; Webb JL *et al.*, 2003; Fornai F *et al.*, 2008).

De façon complémentaire, il a été démontré que chez la souris l'ablation de gènes essentiels pour l'autophagie provoque l'apparition d'un phénotype neurodégénératif avec des troubles de la motricité et la présence d'inclusions intracellulaires (Hara T *et al.*, 2006; Komatsu M *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la MH, les évidences expérimentales présentées par plusieurs groupes indiquent un rôle de l'autophagie. L'induction de l'autophagie provoque la diminution des deux formes, agrégée et soluble, de la HTT mutée et la diminution de la toxicité. D'autres observations ont été utiles afin de comprendre le rôle de l'autophagie dans la MH.

1) La Becline-1 est diminuée dans les cerveaux des patients MH (Shibata M *et al.*, 2006).

2) Les niveaux de Becline-1 sont inversement corrélés à la formation d'agrégats de HTT mutée et la Becline-1 peut se trouver séquestrée dans les agrégats (Shibata M *et al.*, 2006).

2) La rapamycine a un effet neuroprotecteur *in vitro* et *in vivo* dans les modèles (drosophiles et souris) transgéniques de la MH (Ravikumar B *et al.*, 2002 and 2004).

4) Le tréhalose, un disaccharide avec fonction de chaperon chimique, augmente le flux autophagique (mTOR-indépendante) et la dégradation de la HTT mutée (Sarkar S *et al.*, 2007).

IV.4.5 La dysfonction mitochondriale au cours de la MH

En raison de la vulnérabilité particulière du striatum aux mécanismes du stress oxydant la pathogénie de la MH est étroitement liée à la dysfonction mitochondriale (revu dans Damiano M *et al.*, 2010). La description des anomalies mitochondriales au cours de la MH est faite aux cours des sections VI et VII.

V. Mécanismes pathogéniques au cours de la MP

| | | |
|--------------|---|--------|
| V.1 | Mécanismes pathogéniques de la MP : les leçons apprises de la génétique | p. 105 |
| V.2 | Les différents modèles génétiques de MP et leur utilité | p. 106 |
| V.3 | Mécanismes pathogéniques | p. 112 |
| V.3.1 | Protéinopathies, l' α-synucléine et la formation des agrégats | p. 112 |
| V.3.2 | Dysfonction des systèmes de contrôle de qualité | p. 116 |
| V.3.2.a | L' α -synucléine et l'autophagie | p. 117 |
| V.3.2.b | Le système UPS et Parkine | p. 118 |
| | Les fonctions de Parkine | p. 121 |
| | <u>Substrats de Parkine au compartiment synaptique</u> | p. 122 |
| | <u>Substrats de Parkine dans le contexte de la UPR et de l'apoptose</u> | p. 122 |
| | <u>Substrats de Parkine dans le cytoplasme</u> | p. 124 |
| | <u>Substrats de Parkine qui affectent la régulation de la transcription</u> | p. 125 |
| | <u>L'activité E3 de Parkine règle la fonction mitochondriale</u> | p. 125 |
| | <u>Régulation de l'activité de Parkine</u> | p. 126 |
| V.3.2.c | UCH-L1 et la MP | p. 127 |
| V.3.3 | Dysfonction mitochondriale au cours de la MP | p. 128 |
| V.3.3.a | DJ1 : une protéine senseur du stress oxydant | p. 129 |
| V.3.3.b | PINK1 est impliqué dans la mitophagie | p. 130 |
| V.3.4 | Dysfonctions synaptiques au cours de la MP | p. 131 |
| V.3.4.a | L' α -synucléine, la neurotransmission et la fonction pré-synaptique | p. 131 |
| V.3.4.b | Dysfonctions post-synaptiques | p. 134 |
| V.3.5 | Participation des protéines impliquées dans la MPF aux majeures voies de signalisation intracellulaire | p. 135 |

V.1 Mécanismes pathogéniques de la MP : leçons apprises de la génétique

Une grande partie des données sur les mécanismes pathogéniques impliqués dans la MP dérive des études de dénervation dopaminergique striatale complète, obtenue par l'administration des toxines 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) ou 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) dans différents modèles, comme les rats (Schwartzing RK and Huston JP, 1996) et les singes (Jenner P *et al.*, 1986).

Toutefois les études sur les gènes impliqués dans la MP ont fourni une caractérisation moléculaire plus précise de ces mécanismes, qui sont de fait communs aux plus fréquentes formes sporadiques de la maladie.

Globalement à partir des études qui ont exploré la fonction des gènes associés à la MPF plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la mort des neurones dopaminergiques de la SNc. Les hypothèses les plus accréditées accordent un rôle de premier plan i) aux mécanismes qui déterminent le mauvais repliement (systèmes de contrôle de qualité) et l'agrégation des protéines et ii) à la dysfonction mitochondriale et au stress oxydant qui en résulte.

Cette section comprend des approfondissements sur les systèmes de contrôle de qualité ; une attention particulière est donnée aux études concernant les fonctions de la protéine Parkine, le sujet de mon étude publiée.

Comme pour la MH, la description des anomalies mitochondriales causées par Parkine et PINK1 est faite aux cours de la section VI du Chapitre II, section VI : « La fonction mitochondriale et son implication dans la MH et MP » et section VIII dédiée à mon projet sur la MP.

En revanche dans cette section j'ai inclus la description d'autres mécanismes, indispensables pour la physiologie neuronale et qui ont été impliqués, bien que moins univoquement, dans la pathogénie de la maladie, tels que iii) la dysfonction synaptique, et iv) la participation aux voies de signalisation intracellulaires.

C'est probablement la combinaison des défauts de plusieurs de ces mécanismes, dont la régulation converge à des sites multiples, qui déclenche la dégénérescence neuronale au cours de la MP.

V.2 Les différents modèles génétiques de MP et leur utilité

Depuis la découverte des gènes associés aux formes monogéniques on a assisté à une grande prolifération des modèles génétiques (revu dans Dawson TM and Dawson VL 2010; Trancikova A *et al.*, 2011a) dont les plus utilisés sont les modèles murins. Des informations très utiles ont aussi été obtenues par l'étude des modèles de drosophile (Botella JA *et al.*, 2009) ; zebrafish (Steele SL *et al.*, 2013) et *Caenorhabditis elegans* (Harrington AJ *et al.*, 2010).

Modèles murins

Des modèles murins ont été générés surexprimant de façon constitutive ou conditionnelle les formes mutées des gènes associées aux formes dominantes de MP, *SNCA* et *LRKK2*. Les stratégies de surexpression dans ces modèles diffèrent, par exemple dans l'utilisation des promoteurs hétérogènes tels que les promoteurs PrP (Prion Protein), PDGFb (Facteur de croissance des plaquettes), TH (Thyrosine hydroxylase) et Thy-1 (une protéine neuronale), BA (β -Actine). L'utilisation différentielle de ces promoteurs confère différentes propriétés aux gènes surexprimés, concernant la spécificité tissutale et les niveaux d'expression achevés. Dans les modèles à expression conditionnelle les promoteurs *Cre-loxP* basés sur la protéine ROSA26 endogène et le promoteur du CMV réglable par les tétracyclines ont été utilisés (Trancikova A *et al.*, 2011a).

Les gènes associés aux formes récessives *PARK2*, *DJI* et *PINK1* ont été invalidés dans les modèles murins (souris KO, pour Knock Out), afin de modéliser la maladie (Tableau 3).

| GENE | | DELETION (EXON) | REFERENCES |
|---------------------|----|----------------------------|--|
| <i>PARK2</i> | KO | 3 | Goldberg M., 2003 ; Itier J, 2003 ; Stichel C., 2007 |
| | KO | 2 | Perez F <i>et al.</i> , 2005 |
| | KO | 7 | Von Coelln R <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>PINK1</i> | KO | 4-7 | Kitada T <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>DJI</i> | KO | 1-5 | Chen L <i>et al.</i> , 2005 |
| | KO | 2 | Goldberg M <i>et al.</i> , 2005 |
| | KO | 2-5 | Kim R <i>et al.</i> , 2005b |

Tableau 3 (d'après Trancikova A, 2011a) : les groupes qui ont généré les modèles souris KO pour les principaux gènes associés aux formes récessives de MPF sont reportés.

De l'étude de ces modèles il émerge que la perte de fonction de ces gènes provoque des altérations de la neurotransmission toutefois, aucun d'entre eux ne présente une claire dégénérescence dopaminergique.

Des modèles doubles ou triples transgéniques existent, qui se sont révélés utiles afin de découvrir les interactions entre les gènes associés à la MPF.

| DOUBLE/TRIPLE MUTANTS | REFERENCES |
|--|-----------------------------------|
| PrP- A53Tα-syn/DJI-KO | Ramsey C <i>et al.</i> , 2010 |
| PrP- A53Tα-syn/PARK2-KO | Von Coelln R <i>et al.</i> , 2006 |
| Thy-1- A30Pα-syn/PARK2-KO | Fournier M <i>et al.</i> , 2009 |
| BA- α-syn/PARK2-KO | Stichel C <i>et al.</i> , 2007 |
| TH- α-syn/PARK2-KO | Stichel C <i>et al.</i> , 2007 |
| PARK2-KO/PINK1-KO/DJI-KO | Kitada T <i>et al.</i> , 2009 |

Tableau 4 : les groupes qui ont généré les différents modèles des souris doubles ou triples transgéniques qui existent pour étudier la fonction gènes associés à la MPF.

La caractérisation de ces modèles a fourni des informations importantes. Par exemple, les agrégats positifs au marquage pour l' α -synucléine apparaissent, en absence de neurodégénérescence dopaminergique et globalement elles ne sont pas modifiées par l'invalidation des gènes *PARK2* ou *DJI*.

A des âges avancés, les modèles doubles transgéniques créés par Stichel présentent, dans les neurones dopaminergiques, des altérations ultrastructurelles mitochondriales plus marquées par rapport aux contrôles non transgéniques (Stichel CC *et al.*, 2007).

Modèles de drosophile

Les modèles de drosophile créés pour étudier la fonction Parkine et PINK1, se sont révélés très utiles pour la caractérisation des dysfonctions mitochondriales dans les formes récessives de la MP et des interactions fonctionnelles entre les gènes (Greene JC *et al.*, 2003; Pesah Y *et al.*, 2004; Ziviani *et al.*, 2010; Clark IE *et al.*, 2006; Park J *et al.*, 2006; Yang Y *et al.*, 2006).

Des modèles de drosophile existent pour les formes liées aux gènes *SNCA* (Feany MB and Bender WW, 2000; Xun Z *et al.*, 2007 et 2008) et *DJI* (Menzies FM *et al.*, 2005; Meulener M *et al.*, 2005; Park J *et al.*, 2005; Yang Y *et al.*, 2005).

Modèles zebrafish

La stratégie morpholino a été utilisée pour invalider la fonction de Parkine (Flinn *et al.*, 2009), PINK1 (Anichtchik O *et al.*, 2008; Xi Y *et al.*, 2010; Sallinen V *et al.*, 2010; Priyadarshini M *et al.*, 2013), DJ1 (Bretaud S *et al.*, 2007) et LRKK2 (Sheng D *et al.*, 2010; Ren G *et al.*, 2011) dans des modèles zebrafish (*Danio rerio*) (pour une revue Steele SL *et al.*, 2013).

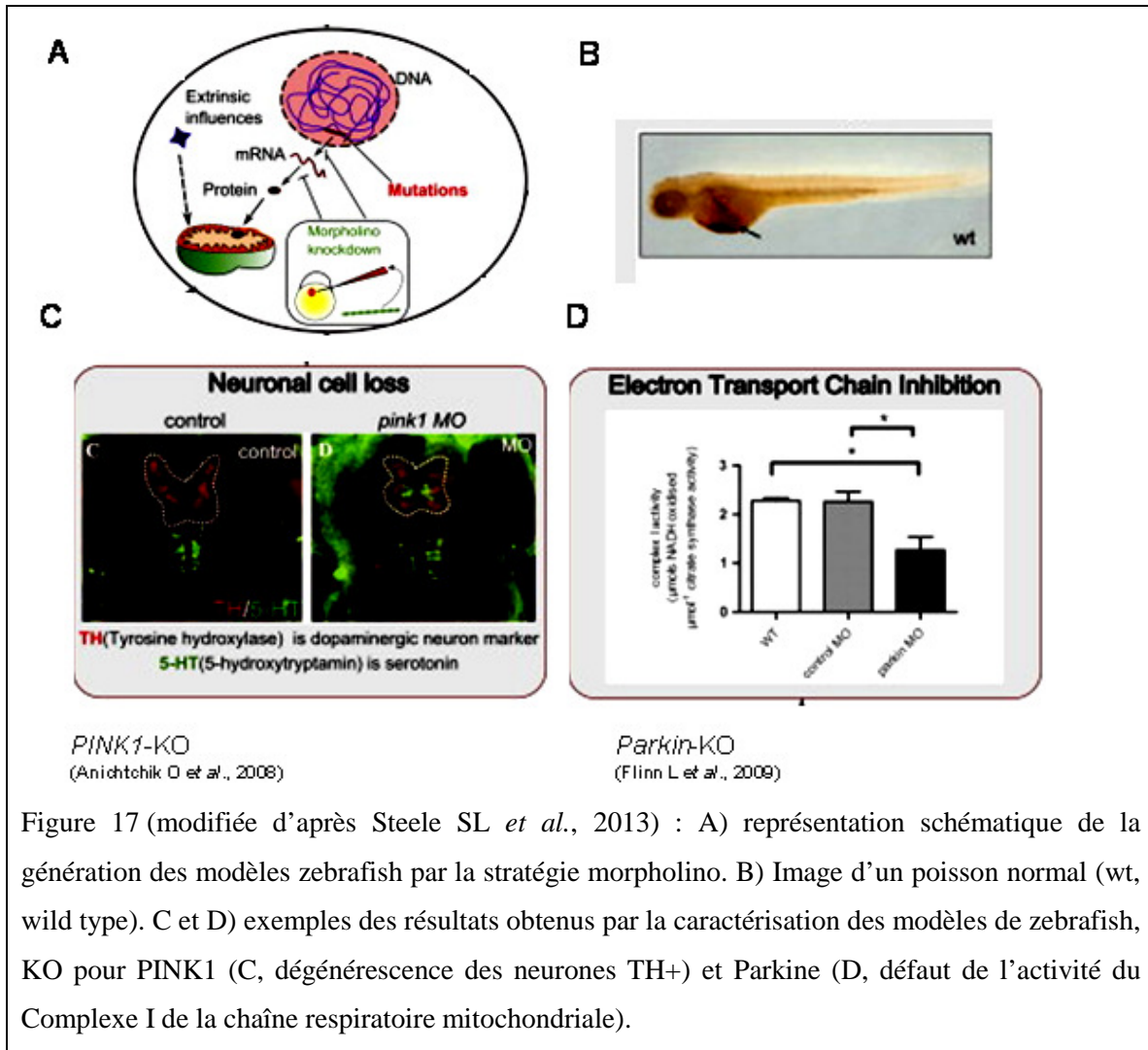


Figure 17 (modifiée d'après Steele SL *et al.*, 2013) : A) représentation schématique de la génération des modèles zebrafish par la stratégie morpholino. B) Image d'un poisson normal (wt, wild type). C et D) exemples des résultats obtenus par la caractérisation des modèles de zebrafish, KO pour PINK1 (C, dégénérescence des neurones TH+) et Parkine (D, défaut de l'activité du Complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale).

Le gène *PARK2* a aussi été surexprimé dans un modèle de zebrafish (Fett ME *et al.*, 2010) ; le rôle anti-apoptotique et neuroprotecteur de cette protéine a été mis en évidence dans l'étude de ce modèle.

Modèles *Caenorhabditis elegans*

Des approches transgéniques ont également été utilisées pour modéliser la MP dans le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les orthologues des gènes associés à la MPF existent dans le nématode y compris, *PARK2* (*PDR-1*), *PINK1* (*rose-1*), *DJ-1* (*djr-1.1, 1.2*), *LRRK2* (*lrk-1*), *ATP13A2* (*capt-6*) et *GBA* (*F11E6.1, TO4A8.7*). Chez le *Caenorhabditis elegans* l'inactivation de ces gènes porte à la dégénérescence des neurones dopaminergiques et une sensibilité accrue aux toxines mitochondriales (Saha S *et al.*,

2009; Ved R *et al.*, 2005; Sakaguchi-Nakashima A, *et al.*, 2007; Karpinar DP *et al.*, 2009; Gitler AD *et al.*, 2009b).

Modèles générés par le transfert, virus-médié, de gènes

L'expression du gène codant pour l' α -synucléine a été ciblée à la SN des rats par transfert de gènes par des vecteurs viraux. Différentes stratégies, utilisant des lentivirus ou des adénovirus (AAV), ont été utilisées. La génération de ces modèles a été utile par exemple dans la caractérisation du processus de formation des agrégats dans la SN (revu dans Tranchikova A *et al.*, 2011a).

Modèles cellulaires

Plusieurs modèles *in vitro* existent pour la MP et trouvent une application extensive dans les protocoles de surexpression ou invalidation des gènes en question.

- 1- Fibroblastes dérivés i) des patients atteints des différentes formes de MPF, (Mortiboys H *et al.*, 2008; Piccoli C *et al.*, 2008; Pacelli C *et al.*, 2011) ii) des modèles murins décrits (Matsuda N *et al.*, 2010; Amo T *et al.*, 2011);
- 2- cultures neuronales dérivées des modèles, murins ou de drosophile (Gispert *et al.*, 2009; Burman *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011) ;
- 3- plusieurs types de lignées cellulaires de mammifères, y compris des lignées de dérivation dopaminergiques (par exemple Yang Y *et al.*, 2006; Exner N *et al.*, 2007; Sandebring A *et al.*, 2009b).
- 4- cellules souches (Perrier Al *et al.*, 2004; Rodriguez-Gomez JA *et al.*, 2007; Sonntag KC *et al.*, 2007; Liu S *et al.*, 2009; Cooper O *et al.*, 2010).

La MP modélisée par invalidation de la fonction mitochondriale dans les neurones dopaminergiques

En plus de ces modèles classiques, à l'appui de l'importance des mécanismes liés à la physiologie mitochondriale dans la pathogénie de la MP, il a été démontré que la présence de défauts de l'ADN mitochondrial suffit à reproduire certaines caractéristiques de la MP, telles que la dégénérescence neuronale progressive, la diminution de la dopamine striatale et un phénotype de troubles de la motricité typiques d'un syndrome parkinsonien, altérations qui témoignent de la dysfonction nigro-striée.

Ces observations ont été faites sur des modèles où les neurones dopaminergiques ont été ciblés pour l'introduction des défauts mitochondriaux tels que : i) défauts de la transcription et de la maintenance de l'ADN mitochondrial (l'invalidation du gène codant pour le facteur de transcription TFAM, (génotype $DAT^{cre/+}; TFAM^{loxP/loxP}$ (Ekstrand MI *et al.*, 2007)) ; ii) ou défauts du complexe I de la chaîne respiratoire (invalidation du gène codant pour la sous-unité Ndufs4 (génotype $DAT^{cre/+}; Ndufs4^{loxP/loxP}$ (Sterky FH *et al.*, 2011)) ; ou encore iii) coupures dans la structure double brin de l'ADN mitochondrial induites par l'expression conditionnelle de l'endonucléase mitochondriale mito-PstI (promoteur DAT-tTA (Pickrell AM *et al.*, 2011).

V.3 Mécanismes pathogéniques

V.3.1 Protéinopathies, l' α -synucléine et la formation des agrégats

La découverte quasi contemporaine que des formes familiales de MP sont liées à des mutations pathogéniques dans le gène *SNCA* et que le produit de ce gène, l' α -synucléine, est la principale protéine composante des LBs, les stigmates de la MP, communs aux formes familiales et aux plus fréquentes formes sporadiques, a mérité à la MP la catégorisation dans les protéinopathies ou aggrégopathies (Polymeropoulos MH *et al.*, 1996 et 1997; Spillantini MG *et al.*, 1997; Singleton AB *et al.*, 2003; Zarranz JJ *et al.*, 2004).

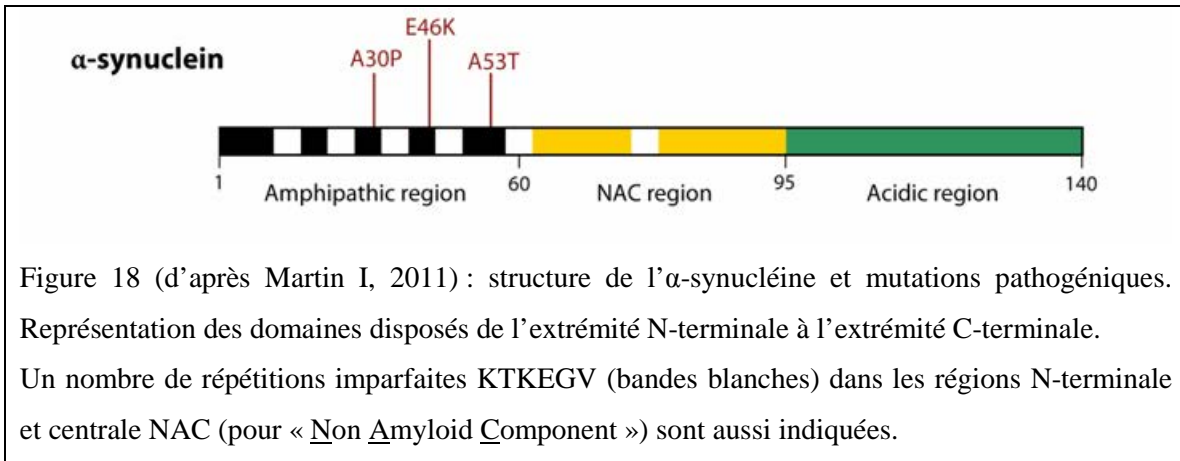
Au cours de la pathogénie des protéinopathies, les inclusions se produisent avant l'apparition de la dégénérescence neuronale et leurs propriétés (taille, forme et composition en protéines) sont caractéristiques pour chaque type de maladie.

Les inclusions de α -synucléine sont mises en évidence dans les synucléinopathies, y compris la MP, la démence à corps de Lewy, (Dementia with Lewy Bodies, DLB), et l'atrophie multi-système (Multiple System Atrophy, MSA), alors que la protéine tau, associée aux microtubules, est la composante majeure de dépôts protéiques dans les tauopathies.

Les inclusions contiennent souvent plusieurs autres protéines du cytosquelette, une variété des protéines HSPs (pour Heat Shock Proteins) et l'ubiquitine (Chin SS and Goldman JE, 1996; Richter-Landsberg C, 2008; Dohm CP, *et al.*, 2008; Jellinger KA, 2012)

Les tauopathies et les synucléinopathies partagent certaines caractéristiques cliniques et pathologiques (Galpern WR and Lang AE 2006; Lee VM *et al.*, 2004) ; de plus il a été montré que l' α -synucléine facilite la fibrillation et l'agrégation de la protéine tau (Geddes JW, 2005; Giasson BI *et al.*, 2003; Riedel M *et al.*, 2009).

In vitro l' α -synucléine est nativement dépliée, manquant de structure secondaire. Pourtant la protéine est capable de se lier, par les répétitions de l'extrémité N-terminale, aux membranes phospholipidiques, adoptant une conformation α -hélicoïdale dans plusieurs sites ; de plus, le domaine hydrophobe central est un domaine β -composant non-amyloïde qui lui confère, en présence de mutations pathogéniques, la capacité de former des agrégats (Bertoncini CW *et al.*, 2005).



La formation des agrégats consisterait en un processus de nucléation : de fait *in vitro* les fibrilles préformées, générées des formes tronquées ou entières de l'α-synucléine recombinante, peuvent rentrer dans les neurones primaires, probablement par un mécanisme d'endocytose, et promouvoir le recrutement de l' α-synucléine endogène soluble dans les LBs and LNs insolubles (Volpicelli-Daley LA *et al.*, 2011).

Ce processus conduit enfin à la formation de structures riches en feuillets β, en forme de oligomères et polymères d'ordre supérieur présents dans les cerveaux des patients MP, des animaux transgéniques et dans le modèles cellulaires exprimant les formes mutées ou multipliées du gène *SNCA* (Lee HJ and Lee SJ., 2002; Miller DW *et al.*, 2004; Sharon R *et al.*, 2004; Lee VM and Trojanowski JQ, 2006; Luk KC *et al.*, 2009; Outeiro TF *et al.*, 2009). La formation des fibrilles est considérée comme nécessaire pour déclencher la dégénérescence (revu dans Martin I *et al.*, 2011).

Des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et l'ubiquitylation de l'α-synucléine au sein de ces structures auraient lieu à l'intérieur de la cellule (Luk KC *et al.*, 2009; Volpicelli-Daley LA *et al.*, 2011).

Les nouvelles découvertes concernant le processus de nucléation des agrégats à la suite l'endocytose des fibrilles préformées expliqueraient comment la neurodégénérescence au cours de la MP, mais aussi d'autres maladies reconnues comme protéinopathies comme la maladie d'Alzheimer et la SLA, ne soit pas un phénomène autonome spécifique d'une région cérébrale, mais au contraire puisse se propager d'une région à l'autre d'une manière similaire à celle observée dans les pathologies déterminées par les prions (pour une revue Jucker M and Walker L, 2013).

En effet les LBs se retrouvent tout le long de l'axe neural et aussi dans les ganglions des plexus de Meissner's et Auerbach du trait gastro-intestinal, dans les neurones du système sympathétiques, dans la médulle de la glande surrénale, dans le cœur et le système de conduction cardiaque (revu dans Goedert M *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont démontré que les inclusions contenant l' α -synucléine apparaissent en une séquence temporelle prédictible dans parties différentes du cerveau ; six stades de progression neuropathologique ont été décrit par rapport à la distribution des LBs. Le bulbe olfactif et le noyau dorsal du nerve vague sont normalement les premières stations intéressées du système nerveux central (stade 1 ; fig. 19). La présence des LBs dans le trait gastro-intestinal innervé par le nerve vague a fourni une première preuve de la propagation du processus d'agrégation le long des circuits nerveux ; toutefois si l'intestin représente la station d'entrée, d'où le processus de fibrillation et formation d'agrégats se propage de manière rétrograde au cerveau via le nerve vague, ou s'il est atteint à la suite de la propagation antérograde des agrégats ayant origine du bulbe olfactif est une question toujours ouverte (Braak H *et al.*, 2006; revu dans Goedert M *et al.*, 2013).

En effet il a été démontré, *in vitro* et *in vivo*, que lorsqu'elle est surexprimée l' α -synucléine peut se propager directement de neurones aux cellules souches embryonnaires saines adjacentes et induire la formation des agrégats (Desplats P *et al.*, 2009). Les greffes de neurones dopaminergiques embryonnaires ou fœtaux transplantés dans le striatum de patients Parkinsoniens développent des LBs positifs au marquage pour l' α -synucléine après seulement 11-16 ans (Kordower JH *et al.*, 2008a et b; Li JY *et al.*, 2008). Ces observations sont étonnantes et représentent un pas énorme dans la compréhension des phénomènes de neurodégénérescence.

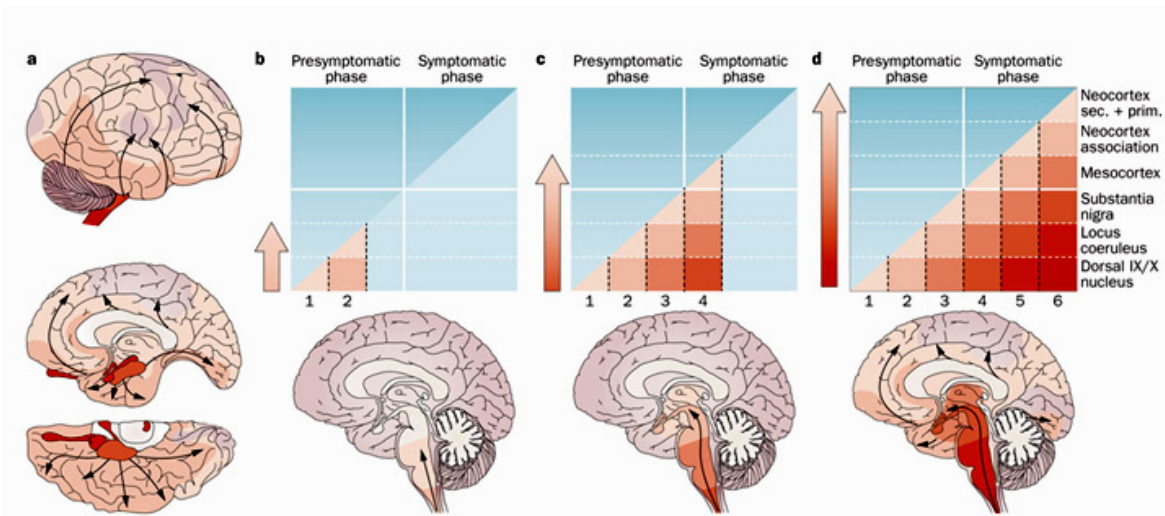


Figure 19 (modifiée d'après Goedert M *et al.*, 2013) : les cas de MP avec les inclusions de α -synucléine peuvent être classifiés selon la distribution des lésions. La progression de la maladie implique la diffusion de la pathologie aux différentes régions cérébrales et la péjoration de la pathologie dans les régions primitivement affectées. **a** | Progression rostro-caudale du processus pathologique (flèches). Les différentes gradations de rouge indiquent la progression de la sévérité de la maladie, le rouge plus foncé correspondant à une atteinte majeure. **b** | Stade 1 : lésions localisées au bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur et/ou le noyau moteur dorsal des nerfs vagal and glossopharyngeal. Stade 2 : les lésions sont observées dans le *tegmentum* pontine (*locus coeruleus*, noyau magnocellular de la formation réticulaire, et noyau du *raphé*). **c** | Stades 3 et 4 : les lésions atteignent le noyau pedunculopontine, le noyau cholinergique magnocellulaire basal, la SNc (stade 3), l'hypothalamus, des parties du thalamus et le mesocortex antéromédial temporal, la première région corticale atteinte (stade 4). L'apparition des symptômes cliniques de MP correspond au stade 3 ou à la phase précoce du stade 4. **d** | Stades 5 et 6 : les lésions atteignent les régions associatives du neocortex de deuxième (stade 5) et premier ordre et les régions primaires (stade 6).

In vivo plusieurs facteurs biologiques et environnementaux peuvent contribuer à la formation des fibrilles et d'oligomères d' α -synucléine.

La dopamine ou les sous-produits dérivant de son oxydation peuvent avoir un impact direct sur la conformation de l' α -synucléine, favorisant la formation des structures protofibrillaires et des agrégats toxiques (Conway KA *et al.*, 2001; Outeiro TF *et al.*, 2009).

Le stress oxydant et nitrosatif favorise l'agrégation de l' α -synucléine (Giasson BI *et al.*, 2000). Avec l'âge, l'augmentation des niveaux du stress oxydant et l'accumulation des dégâts dans les macromolécules peuvent favoriser l'agrégation.

L'exposition aux toxines mitochondriales telles que la roténone et le paraquat peut également promouvoir l'agrégation de l' α -synucléine (Manning-Bog AB *et al.*, 2002; Sherer TB *et al.*, 2002).

Fait intéressant : l'observation que dans des conditions de stress l'association entre α -synucléine et Parkine augmente au niveau des inclusion ubiquitylées (Choi P *et al.*, 2001) a suggéré que l' α -synucléine est un substrat de Parkine (Shimura H *et al.*, 2001).

Le manque des agrégats dans les formes de MPF associées aux mutations du gène Parkine pourrait donc suggérer que l'ubiquitylation des protéines composantes des Corps de Lewy est un mécanisme de défense envers la toxicité de l' α -synucléine (Petrucci L *et al.*, 2002; Yang Y *et al.*, 2003; Yamada M *et al.*, 2005).

V.3.2 Dysfonctions des systèmes de contrôle de qualité

La présence des LBs, constitués de protéines mal-repliées et modifiées et de protéines chaperonnes Hsp (pour Heat shock proteins ; Hsp 90, Hsp 70 et le co-chaperon Hsp 40 dans le cas des LBs), suggère que le stress intracellulaire et les systèmes de protéostasie et de contrôle de qualité jouent un rôle dans leur formation.

L'augmentation des niveaux des protéines Hsp représente une première ligne de défense lorsque les protéines anormalement repliées s'accumulent : elles gardent les protéines endommagées dans un état déplié, empêchant leur agrégation irréversible, afin de les rendre aptes à être repliées.

Le réticulum endoplasmique, RE, est le siège d'un deuxième mécanisme pour dégrader les protéines endommagées. Lorsque le repliement des protéines sécrétoires dans le RE est défectueux, elles sont rétro transportées dans le RE et y sont dégradées par le système de dégradation spécifique ERAD (pour Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Le système UPR (pour Unfolded Protein Response) s'active dans le RE lorsqu'on dépasse sa capacité de replier ou dégrader ces protéines (pour une revue Ron D and Walter P, 2007). Pendant l'activation de la UPR, la cellule active des chaperons, comme

BiP (pour « ER Luminal Binding Protein »), composant de l'ERAD, et en même temps inhibe la translation des protéines.

A son tour la faillite de l'UPR à restaurer l'homéostasie du RE, ou son excessive activation, déclenchent l'apoptose (Kim I *et al.*, 2008).

Un troisième mécanisme de la machinerie de dégradation des protéines consiste en la formation de l'agrésome, soit des inclusions autour du centre organisationnel des microtubules proches ou comprenant le centrosome (Johnston JA *et al.*, 1998). Les protéines destinées à la dégradation aggresomale sont activement transportées le long des microtubules au centrosome. Les agrésomes sont dégradés par la macroautophagie (Johnston JA *et al.*, 1998) déjà décrite dans la section IV, relative à la pathogénie de la MH.

Une coopération étroite existe entre ces systèmes des chaperons moléculaires et le UPS (pour Ubiquitin-Proteasome System), le système le plus important de dégradation des protéines. Plusieurs composantes de l'UPS, comme les enzymes E2, certains chaperons et l'ubiquitine sont aussi des composantes de l'ERAD ou prennent part dans l'organisation de l'agrésome (revu dans Rankin CA *et al.*, 2011; Olanow CW *et al.*, 2004). Certains agrégats, à cause de leurs dimensions, sont normalement exclus du protéasome. Ils peuvent être dégradés alors par l'activation de la machinerie de l'autophagie (Jellinger KA, 2010).

La formation des agrégats peut dériver d'une dysfonction dans chacune de ces étapes des systèmes de protéostasie. Le rôle des agrégats dans la pathogénie de plusieurs maladies neurodégénératives est toujours débattu. Dans une première phase de la dégénérescence neuronale, ils pourraient représenter un mécanisme pour séquestrer des protéines qui, ayant perdu leur conformation, résulteraient toxiques si elles étaient solubles ; en cercle vicieux, avec la progression de la neurodégénérescence ils pourraient devenir une surcharge pour les systèmes de contrôle de qualité.

V.3.2.a L' α -synucléine et l'autophagie

A propos de l' α -synucléine, il n'est pas toujours clair si un mécanisme en particulier, entre l'UPS, l'autophagie par chaperons ou la macro-autophagie est responsable de sa

dégradation (Bennett MC *et al.*, 1999; Paxinou E *et al.*, 2001; Webb JL *et al.*, 2003). Ces mécanismes pourraient coopérer. Néanmoins il semble que l'inhibition de l'autophagie soit plus marquante, par rapport à l'inhibition de l'UPS, dans la prévention de la dégradation de l' α -synucléine, qui d'ailleurs est repérée dans des vésicules morphologiquement similaires aux vésicules autophagiques. De plus, l'activateur de l'autophagie, la rapamycine, promeut sa dégradation (Webb JL *et al.*, 2003) et, de manière spéculaire, dans des conditions d'inhibition de l'autophagie la monoubiquitylation de l' α -synucléine promeut la formation d'agrégats (Rott R *et al.*, 2008).

V.3.2.b. Le système UPS et la fonction de Parkine

Au delà de la présence des LBs dans les formes sporadiques de la MP, l'hypothèse que les dysfonctions des systèmes de contrôle de qualité et en particulier du système UPS puissent avoir un rôle dans la pathogénie de la maladie est soutenue par l'étude des protéines associées à la MPF. De celles-ci deux, Parkine et F-box 7 jouent un rôle dans la conjugaison de l'ubiquitine aux substrats, et une troisième, UCH-L1, est un enzyme de de-ubiquitylation.

Les protéasomes consistent en des grands complexes avec activité de protéase, constitués de multiples domaines catalytiques. Ils sont présents dans le cytosol et le noyau de toutes les cellules eucaryotes afin de dégrader les protéines dans le contexte des systèmes de contrôle de qualité et de l'équilibre protéostatique de la cellule (Peters JM *et al.*, 1994)

Le protéasome 26S est un complexe multi-catalytique, constitué de l'unité catalytique centrale 20S, et des unités régulatrices périphériques 19S (Fig. 20). L'unité 20S contient six résidus de sérine, au niveau desquels se localise l'activité de protéase dépendant de l'ATP, avec activités chymotrypsine, trypsine et caspase-simile.

L'ubiquitine, Ub, est un peptide de 79 acides aminés (9,8 kDa) présent dans toutes les cellules. L'ubiquitylation des protéines représente une modification post-traductionnelle des plus importantes dans la régulation de plusieurs aspects de la biologie cellulaire (Komander D and Rape M, 2012). Il s'agit d'une cascade enzymatique en trois étapes : i) l'activation de l'Ub par l'enzyme E1 ; ii) la conjugaison de l'Ub à un enzyme E2 ; iii) le

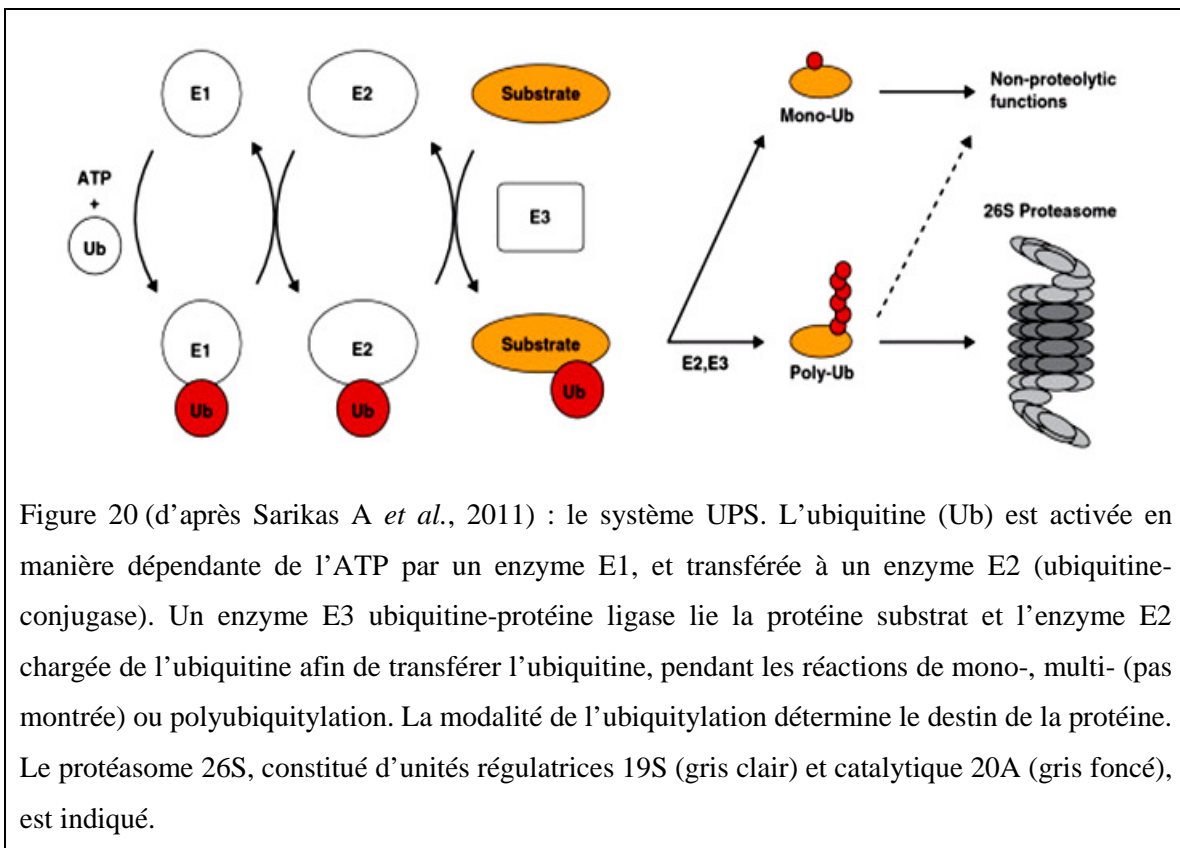
transfert de l'Ub à son substrat par des ligases E3. Les ligases E4 catalysent l'élongation des chaînes de ubiquitine.

Le début de l'ubiquitylation consiste en la formation d'un lien entre le résidu de Glycine (Gly) C-terminal de Ub et le groupe aminé ε d'un résidu de Lysine (Lys) de la protéine cible.

Il existe au moins trois types d'ubiquitylation des protéines selon le site d'une Ub déjà attachée où la chaîne de molécules de Ub s'allonge: i) formation des chaînes de poly-Ub sur la Lys 48, ii) formation des chaînes de poly-Ub sur la Lys 63, et iii) multimonoubiquitylation, au cours de laquelle Ub se fixe à plusieurs résidus Lys d'une même protéine, une seule Ub y est attachée.

La présence d'au moins quatre résidus de Ub, liés à la Lys 48, cible la protéine à la dégradation par le système UPS.

Par contre la présence de chaînes de polyUb formées sur les résidus Lys 63 a des fonctions non protéolytiques et peut représenter un signal pour l'activation de certaines kinases ou pour l'endocytose (Pickart CM, 2001a; Sun L and Chen ZL, 2004)



En ce qui concerne les ligases E3, les grandes protéines contenant un domaine RING (Really Interesting New Gene) peuvent fonctionner comme sous-unités uniques, lorsque les petites protéines contenant un domaine RING forment des complexes multimériques, comme dans la famille des ligases E3 CRL (pour Cullin Ring Ligases), comprenant les complexes Skp1-Cullin-F-box, SCF. Ces complexes sont constitués par une protéine d'échafaudage (Cullin ou Skp), une protéine « ring-finger », et une protéine adaptatrice, souvent une protéine Fbox, pour la liaison au substrat (Pickart CM, 2001b; Deshaies RJ and Joazeiro CA, 2009; Feldman RM *et al.*, 1997). La spécificité de la réaction d'ubiquitylation est réglée par les ligases E3 (Pickart CM, 2001b).

Deux classes distinctes de ligases E3 existent qui agissent avec des mécanismes différents. Les ligases E3 RING transfèrent l'Ub du résidu de Cystéine catalytique de E2 au substrat, elles fonctionnent donc comme adaptateurs ; les ligases E3 HECT (pour Homologous to E6AP Carboxy-Terminus) lient directement l'Ub par formation d'un intermédiaire thioestère avant de transférer l'Ub au substrat (Dye BT and Schulman BA, 2007).

Récemment, un troisième mécanisme, hybride, a été décrit pour les ligases E3 RBR (pour RING Between RING) (Wenzel DM *et al.*, 2011). Dans les ligases E3 RBR le domaine RING1 transfère l'Ub du E2 à une Cystéine (Cys) catalytique du domaine RING2 ; le résidu de Ub est ensuite transféré au substrat (Wenzel DM *et al.*, 2011; Wenzel DM and Klevit RE, 2012).

13 RBR ligases E3 existent chez l'homme, y compris Parkine (Wenzel DM and Klevit RE, 2012 ; Byrd RA and Weissman AM, 2013) (Fig.21).

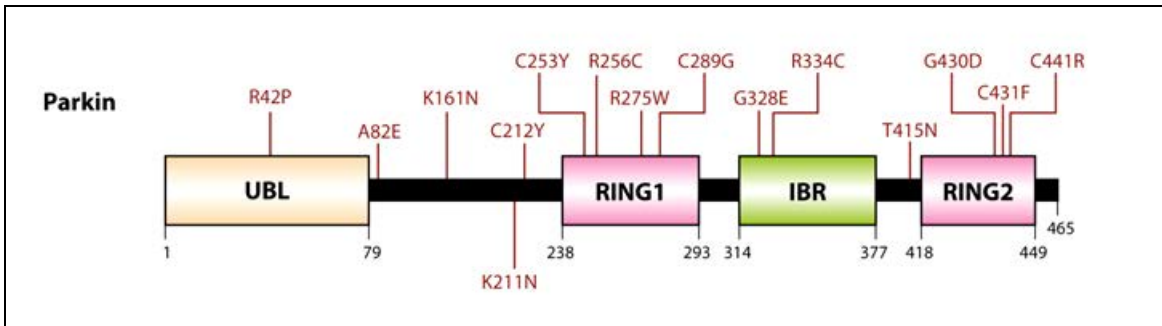


Figure 21 (d'après Martin I, 2011) : structure de Parkine et mutations pathogéniques. La représentation des domaines, disposés de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, comprend : les domaines UBL (pour « Ubiquitin-Like ») et les deux RING (pour « Really Interesting New Gene »), séparés par un IBR domaine (pout « In-Between RING »).

L'ubiquitylation ou plus fréquemment la polyubiquitylation des protéines peut contribuer à régler leur localisation, l'assemblage en complexes, l'activité ou encore le 'turnover' d'un substrat.

Les fonctions de Parkine

Comme E3 ubiquitine-protéine ligase, Parkine interagit avec un nombre de partenaires et substrats putatifs dans plusieurs compartiments cellulaires et dans différentes conditions physiologiques : i) au compartiment synaptique, ii) dans le cytoplasme et sur le cytosquelette, iii) directement à la mitochondrie ; d'autre part elle intervient dans la régulation de protéines dans différentes conditions de stress cellulaire et pendant l'apoptose.

Ces interactions lui confèrent la capacité d'intervenir dans la régulation des fonctions très importantes de la physiologie neuronale. De plus, Parkine est médiatrice des deux types d'ubiquitylation, sur les résidus K48 et K63. L'ubiquitylation K63 des substrats est censée médier des activités protéasome-indépendantes, telles que la réparation de l'ADN, l'endocytose et la signalisation *via* le NfκB ; il a été proposé que les deux types d'ubiquitylation pourraient être activées comme stratégies alternatives pour éviter la surcharge de l'UPS (pour revue Lim KL and Lim GG, 2011).

Substrats de Parkine au compartiment synaptique

La protéine 1 du contrôle de la division cellulaire (Cell Division Control related protein 1, CDCrel-1), une protéine d'environ 44 kDa appartenant à la famille des Septines, est un substrat de Parkine ciblé à la dégradation. CDCrel-1 est associée aux vésicules synaptiques dont elle régleme la libération (Zhang Y *et al.*, 2000). Cette activité est altérée en présence des formes mutées de Parkine (Dawson TM and Dawson VL, 2003).

D'autres protéines synaptiques sont ciblées à la dégradation dépendante du protéasome par Parkine, dont synaptotagmine XI (Huynh DP *et al.*, 2003), synphilin-1, une protéine associée à l' α -synucléine (Chung KK *et al.*, 2001), et la forme O- glycosylée de 22 kDa de l' α -synucléine (α Sp22) (Shimura H *et al.*, 2001). L'interaction entre Parkine, synphilin-1 et α -synucléine pourrait être importante dans le processus de formation des agrégats (Chung KK *et al.*, 2001).

La forme non glycosylée, mal repliée, du transporteur de la dopamine (DAT) est un substrat de Parkine pour l'ubiquitylation et la dégradation (Jiang H *et al.*, 2004). Dégradant la forme mal repliée de DAT, Parkine favorise l'expression et la fonction de sa forme native.

Les protéines PDZ (pour PSD-95, Disc large, Zona occludens), CASK (Fallon L *et al.*, 2002) et PICK (Joch *et al.*, 2007) interagissent avec Parkine mais elles ne sont pas des substrats pour la dégradation. L'interaction avec ces protéines a lieu par de courtes séquences spécifiques au niveau du domaine C-terminal de Parkine, dans le contexte de la formation des complexes multiprotéiques à la densité post synaptique ; ces complexes contiennent la protéine PDZ, PSD-95, la sous-unité NR2B des récepteurs NMDR et la protéine kinase calcium-calmoduline- dépendante II, CaMKII, 1a. Dans ce contexte Parkine est médiatrice de la monoubiquitylation de PICK qui semble prévenir l'hypéraction des canaux ioniques et l'excitotoxicité (Joch M *et al.*, 2007).

Substrats de Parkine dans le contexte de la UPR et de l'apoptose

Imai et ses collaborateurs ont observé que le récepteur Pael-R (pour Parkin associated endothelin-like Receptor), un polypeptide transmembranaire couplé à la protéine G est aussi un substrat de Parkine pour la dégradation (Imai Y *et al.*, 2001). Pael-R est très exprimé dans les neurones TH+, dopaminergiques, et il a été trouvé accumulé dans le

cerveau des patients atteints des formes récessives à début précoce de MP (Imai Y *et al.*, 2001; Dawson TM and Dawson VL, 2003).

La surexpression de Pael-R élicite l'activation de l'UPR et la mort cellulaire à la suite de la formation d'agrégats insolubles dans le réticulum endoplasmique, RE. Lorsqu'elle est surexprimée, Parkine favorise, avec l'aide des E2s Ubc6 et Ubc7, situées dans le RE, la dégradation des agrégats insolubles de Pael-R (Imai Y *et al.*, 2001; Dawson TM and Dawson VL, 2003). D'autre part, l'activation de la UPR, provoquée par une variété de stress, y compris H₂O₂ et choc thermique, cause l'augmentation des niveaux des protéines marqueurs spécifiques, comme BiP, et de la même Parkine afin de prévenir une hyperactivation de ce système (Imai Y *et al.*, 2000; Yang Y *et al.*, 2003), jouant ainsi un rôle neuroprotecteur.

Dans le contexte de la UPR, la formation d'un complexe fonctionnel constitué par Parkine, et les protéines chaperonnes Hsp70 et CHIP (pour Carboxyl Terminus of the Hsc-70 Interacting Protein) a un rôle clé dans la détermination du destin des protéines ; par ailleurs la formation de ce complexe représente un mécanisme additionnel pour régler les niveaux de Pael-R.

Le chaperon Hsp70, de manière dépendante de l'ATP, règle par des cycles de liaison/détachement aux sites hydrophobes des protéines cibles, la renaturation des protéines qui reprennent leur conformation native dès qu'elles sont libérées (Bukau B and Horwich AL, 1998). En revanche CHIP empêche l'interaction entre la protéine cible (Pael-R est un cas) et Hsp70 et rend la protéine en question disponible pour l'ubiquitylation et la dégradation (Ballinger CA *et al.*, 1999). Les deux, Hsp 70 et CHIP, interagissent avec Parkine, mais l'interaction entre Parkine et CHIP est plus forte que celle entre Parkine et Hsp70 (Imai Y *et al.*, 2002). L'activité de Parkine serait facilitée dans ce contexte, augmentant la dégradation de Pael-R.

BAG 5, une autre protéine qui empêche l'activité chaperonne de Hsp70 serait importante dans la formation des LBs. Parkine constituerait la cible de BAG5, se retrouvant séquestrée au sein des LBs suite à l'interaction avec elle (Kalia SK *et al.*, 2004).

La sous-unité p38 du complexe aminoacyl-ARNt-synthétases, ARS, est une protéine importante dans le contexte de la synthèse protéique et dans la signalisation apoptotique (Ivanov VN and Ronai Z, 2000; Corti O *et al.*, 2003). p38 est aussi ciblée par Parkine à la dégradation *via* le UPS (Corti O *et al.*, 2003). La mort cellulaire, qui suit la surexpression et l'accumulation de p38 peut être prévenue par la surproduction concomitante de Parkine. La protéine p38 se retrouve localisée dans les LBs.

Dans le contexte des voies de signalisation qui mènent à l'activation des réponses liées au stress et à l'UPR, il a été remarqué que la sous-unité $\gamma 1$ de la phospholipase C, PLC $\gamma 1$ est un substrat de Parkine pour la dégradation (Dehvari N *et al.*, 2008). L'importance de cette interaction est discutée après dans le paragraphe V.3.5 : Participation des protéines impliquées dans les formes hérédodégénératives de MP aux majeures voies de signalisation intracellulaire.

Substrats de Parkine dans le cytoplasme

La Parkine est capable d'interagir avec Culline 1 et Fbw7 (**ou Fbox7**, voir section I : génétique de la MP), dans le complexe SCF^{Fbw7}, pour dégrader la cycline E (Staropoli JF *et al.*, 2003). L'activation des cyclines semble avoir un rôle dans les mécanismes de neurodégénérescence, probablement par un mécanisme de réactivation du cycle cellulaire (Verdaguer E *et al.*, 2002; Becker EB and Bonni A, 2004) ; des niveaux plus élevés de cycline E ont été constatés dans le cerveau de patients porteurs de mutations dans le gène *PARK2* (Staropoli JF *et al.*, 2003).

Toujours dans le cytoplasme, la Parkine interagit avec le système des microtubules. Les microtubules sont formés par des hétérodimères de α/β tubuline ; ainsi les niveaux de chaque monomère, α ou β , sont strictement réglés. La Parkine est responsable de l'ubiquitylation et la dégradation des la α - et de la β - tubuline (Ren Y *et al.*, 2003; Zhao J *et al.*, 2003). En conditions de stress la Parkine lie les microtubules avec grande affinité, faisant fonction de MAP (pour Microtubule Associated Protein) en les stabilisant (Ren Y *et al.*, 2003). Ces interactions auraient un rôle dans la régulation de la formation de

l'agrégosome. La Parkine y intervient, étant recrutée au centrosome, lorsque le système UPS est inhibé (Zhao J *et al.*, 2003; Jiang Q *et al.*, 2008).

Substrats de Parkine qui affectent la régulation de la transcription

SIM 2 est un facteur de transcription localisé dans le noyau, à brève durée de vie. Il représenterait aussi un substrat de Parkine pour la dégradation. En effet il a été démontré qu'une fraction mineure de Parkine, normalement est localisée dans le cytoplasme, peut se retrouver dans le noyau (Okui M *et al.*, 2005).

Ran BP2 est un substrat de Parkine pour l'ubiquitylation et la dégradation (Um JW *et al.*, 2006). Il s'agit d'une SUMO (pour Small Ubiquitin MOdifiers) ligase E3. Ran BP2 est aussi une composante du complexe du pore nucléaire (Fried H and Kutai U, 2003), pour la régulation de l'export des cargos du noyau. Dans ce contexte, Ran BP2 règle les niveaux de HDAC4, une déacétylase responsable de la condensation de la chromatine et de la répression de la transcription.

L'activité E3 de Parkine règle la fonction mitochondriale

Fbw7 est la protéine adaptatrice dans le complexe SCF^{Fbw7} (Deshaies RJ and Joazeiro CA, 2009; Feldman RM *et al.*, 1997).

Il a été montré que par son activité E3 ubiquitine-protéine ligase Parkine directement et indirectement joue un rôle anti-apoptotique : en conditions de stress Parkine est directement responsable de la poly-ubiquitylation de la protéine pro-apoptotique Bax, prévenant son accumulation à la mitochondrie et l'activation de l'apoptose dépendante des caspase (Johnson BN *et al.*, 2012). De plus, Parkine stabilise indirectement la protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-1, Mcl-1, localisée sur la membrane externe mitochondriale. Celle-ci serait ubiquitylée, *via* le complexe SCF^{Fbw7} et ciblée au protéasome. La Parkine, dégradant Fbw7, prévient la dégradation de Mcl-1 et contribue à la survie des neurones en conditions de stress oxydant (Ekholm-Reed S *et al.*, 2013).

En réalité l'interaction entre Parkine et Fbw7 pourrait aller au-delà de la relation ligase E3-substrat et jouer un rôle dans la régulation de la voie mitophagique dépendant de Parkine et PINK1, comme il a été très récemment suggéré (Burchell VS *et al.*, 2013).

Le modulateur essentiel de NFkB (NFkB Essential Modulator, NEMO) est réglé positivement par Parkine : cette interaction à son tour comporte l'activation de l'expression de *OPA1*, stimulant la fusion mitochondriale, la production de l'ATP et ainsi la réponse pro-survie de la cellule (Muller-Rischart AK *et al.*, 2012).

Le répresseur de la transcription PARIS (Parkin Interacting Substrate) est un substrat pour l'ubiquitylation et la dégradation médiée par Parkine et il s'accumule dans le cerveau des patients avec des mutations de *PARK2* (Shin JH *et al.*, 2011). La cible de PARIS est PGC-1 α , un facteur central dans la régulation de la transcription mitochondriale, décrit dans la section VI, relative à la fonction mitochondriale. L'action de Parkine sur PARIS semble être spécifique sur les neurones de la SNc.

De plus, d'autres protéines mitochondriales au sens strict sont ciblées à la dégradation par Parkine, directement à la mitochondrie. Il s'agit des protéines VDAC, Mfns et Miro ; le rôle de Drp1 comme substrat de Parkine pour la dégradation est encore discuté. Le rôle de ces interactions est important dans le contexte de la mitophagie, de la dynamique et de la morphologie mitochondriale et est traité dans la section VI.

Régulation de l'activité de Parkine

La régulation de la Parkine peut avoir lieu au niveau transcriptionnel. L'expression du gène Parkine est augmentée par ATF4 : effectivement, un site de lien CREB/ATF4 est présent dans le promoteur du gène *PARK2* (Bouman L *et al.*, 2011), ce qui pourrait expliquer le rôle que la protéine joue dans la réponse UPR.

Entre les autres facteurs de transcription, p53 aurait aussi un rôle positif sur la transcription du gène *PARK2* ; au contraire c-Jun et N-myc auraient un effet de répression (West AB *et al.*, 2004; Zhang C *et al.*, 2011).

Les modifications post-translationnelles réglant l'activité de Parkine sont l'auto-ubiquitylation, la phosphorylation et la S-nytrosilation. Il a été démontré que l'auto-ubiquitylation est facilitée par la présence de la forme clivée de la protéine PINK1 (Xiong H *et al.*, 2009; Chaugule VK *et al.*, 2011). L'interaction avec la protéine SUMO E3 ligase Ran BP2 faciliterait l'auto-ubiquitylation de Parkine, non l'ubiquitylation directe de Parkine par Ran BP2 (Um JW *et al.*, 2006).

La phosphorylation de Parkine, constitutivement active sur plusieurs résidus de sérine, est faite par les kinases PKA, PKC et CK-A ou la c-Abl tyrosine kinase et règle négativement l'activité de Parkine. Cette phosphorylation est inhibée pendant des situations de stress (Yamamoto A *et al.*, 2005; Imam SZ, *et al.*, 2011).

La S-nytrotilation de la Parkine sur des résidus de cystéine règle son activité (Chung KK *et al.*, 2004 ; Yao D *et al.*, 2004). Cette régulation serait bi-phasique : dans les cellules en culture exprimant Parkine la présence de S-nytrocytostéine déterminerait précocement l'activation de Parkine, en revanche des traitements prolongés, jusqu'à 24h ou plus, détermineraient son inhibition (Yao D *et al.*, 2004).

Enfin, les interactions entre Parkine et certains de ses substrats représentent des mécanismes de régulation de son activité.

Par exemple, au sein de l'interaction avec Hsp70, déjà décrite, l'activité de Parkine est inhibée, par un mécanisme de lien compétitif au substrat (Kalia SK *et al.*, 2004; Imai Y *et al.*, 2002). L'interaction compétitive de Parkine et α -synucléine avec la protéine 14-3-3 η , une autre protéine similaire aux chaperons, a été observée. L'augmentation de l'expression de la α -synucléine enlève l'inhibition que la protéine 14-3-3 η produit sur l'activité de Parkine (Sato S *et al.*, 2006).

V.3.2.d UCH-L1 et la MP

La protéines UCH-L1 (pour Ubiquitin Carboxy Terminal Hydrolase 1), une des plus abondantes dans le cerveau, se retrouve dans les Corps de Lewy (Lowe J *et al.*, 1990). Il s'agit d'un enzyme de de-ubiquitylation spécifique des neurones ; son domaine C-terminal lui confère une activité d'hydrolyse des liaisons entre les molécules d'ubiquitine ; cette activité de UCH-L1 assure le recyclage des molécules d'ubiquitine.

Également, un rôle de ubiquitine ligase a été suggéré pour UCH-L1 (Liu Y *et al.*, 2002).

En 1998, une variante faux-sens à l'état hétérozygote de *UCH-L1* (Ile93Met) a été associée dans une famille allemande à une forme autosomique dominante de MPF (*PARK5*, OMIM 613643) (Leroy E *et al.*, 1998). La protéine UCH-L1 Ile93Met mutée a en effet une activité hydrolytique réduite à 50% de l'activité de la protéine sauvage, par conséquent, les sujets porteurs de cette mutation sont censés avoir 75% de l'activité

normale. Depuis cette première famille, aucune autre mutation pathogénique de *UCH-L1* n'a été identifiée dans les formes familiales et sporadiques de MP, mais seulement un polymorphisme (Ser18Tyr) (Lincoln S *et al.*, 1999; Wintermeyer P *et al.*, 2000). Le rôle pathogénique ou protecteur de ce polymorphisme ainsi que la réelle association du gène *UCH-L1* avec la MPF sont discutés (Healy DG *et al.*, 2006 ; Maraganore DM *et al.*, 2004 ; Ragland M *et al.*, 2009). Toutefois l'expression de *UCH-L1* a été montrée diminuée dans le cerveau des patients atteints de MP et de Maladie d'Alzheimer (Choi J *et al.*, 2004).

Récemment la mutation Glu7Ala de *UCH-L1* a été associée à une maladie neurodégénérative de l'enfance caractérisée par la cécité, l'ataxie cérébelleuse, le nystagmus, la dysfonction de la colonne dorsale, la spasticité et autres signes de dysfonctionnement des neurones moteurs supérieurs (Bilguvar K *et al.*, 2013). Dans cette famille aucun des membres affectés ne présente les signes d'un syndrome parkinsonien. Certes, les données génétiques ne sont pas conclusives pour confirmer l'association entre *UCH-L1* et la MP, néanmoins ils témoignent de l'importance des protéines associées au système UPS dans la neurodégénérescence.

V.3.3 Dysfonction mitochondriale au cours de la MP

Comme l'on a vu dans la section IV, les neurones dopaminergiques sont plus vulnérables aux dégâts provoqués par le stress oxydant. Plusieurs sources des radicaux libres comme le RE ou les NADPH oxydases (NOXs) peuvent avoir un rôle dans la MP (Choi DH *et al.*, 2012), mais la mitochondrie est toujours considérée comme la source la plus importante.

Plusieurs aspects de la physiologie mitochondriale ont été trouvés altérés chez les patients atteints ou dans les différents modèles de MP : biogenèse, homéostasie du Ca^{2+} , phosphorylation oxydative, mitophagie, morphologie et dynamique mitochondriales. Ces aspects sont décrit de manière plus détaillée dans le Chapitre 2 plus spécifiquement dans la section VI, relative à la physiologie mitochondriale ; la fission et la fusion mitochondriales, qui sont le sujet de mon étude, sont traitées dans la section VIII : Projet II.

Afin de compléter la vision globale des protéines liées aux formes de MPF il est utile dans cette section rappeler certains détails des fonctions de DJ1 et PINK1 dont la structure et les fonctions sont étroitement liées à la physiologie mitochondriale

V.3.3.a DJ1 une protéine senseur du stress oxydant

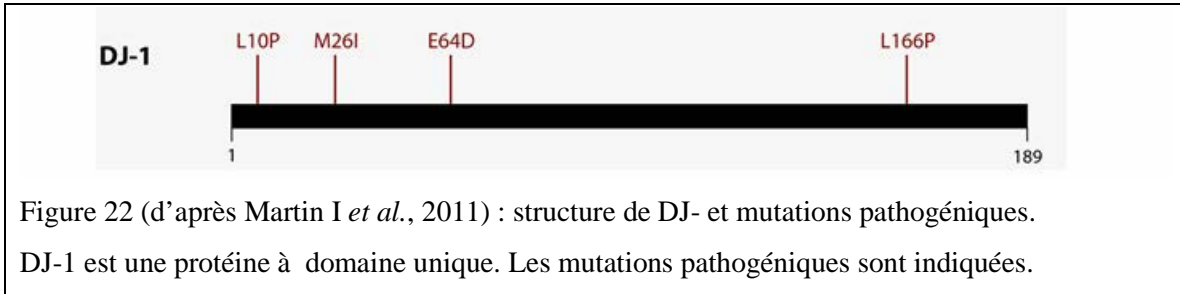


Figure 22 (d'après Martin I *et al.*, 2011) : structure de DJ- et mutations pathogéniques. DJ-1 est une protéine à domaine unique. Les mutations pathogéniques sont indiquées.

DJ1, initialement décrite comme une protéine chaperonne redox-sensible (Shendelman S *et al.*, 2004; Zhou W *et al.*, 2006), est reconnue participer directement à la modulation du stress oxydant. La protéine endogène a été trouvée associée à la mitochondrie dans l'espace inter-membrane et dans la matrice, même si sa localisation est surtout cytoplasmique.

A la suite d'un changement de son point isoélectrique, DJ1 serait capable de s'auto-oxyder sur le résidu de Cystéine, Cys 106. Ce changement serait déterminant pour sa capacité d'éliminer la H₂O₂ produite en excès pendant le stress oxydant (Canet-Avilés RM *et al.*, 2004; Taira T *et al.*, 2004) ; de plus la protéine a été reconnue avoir une activité de peroxydase similaire à la peroxyrédoxine (Andres-Mateos E *et al.*, 2007).

L'absence de DJ1 cause l'augmentation de la production des EROs et de la susceptibilité aux toxines mitochondriales (Kim RH *et al.*, 2005b). DJ1 peut stabiliser Nrf2 (Nuclear erythroid related factor 2), un régulateur essentiel de la transcription de gènes antioxydants. Interférant dans l'interaction entre Nrf2 et son inhibiteur Keap1, DJ1 empêche l'ubiquitylation et la dégradation de Nrf2 et par conséquent augmente la transcription des gènes antioxydants (Clements CM *et al.*, 2006).

D'autres fonctions de DJ-1 pourraient expliquer son rôle dans la modulation des réponses intracellulaires au stress oxydant. Il intervient dans la régulation i) des voies de signalisation redox kinase dépendante (Kahle *et al.*, 2009) ; ii) des systèmes de défense anti-oxydants réglant positivement la synthèse du glutathion (Zhou W and Freed CR,

2005) ou l'expression des gènes *SODs* ; iii) de médiateurs clé de l'apoptose comme p53 et Pten (Gaiame E *et al.*, 2010; Kim RH *et al.*, 2005a).

V.3.3.b PINK1 est impliqué dans la mitophagie

Douée d'un domaine d'adressage à la mitochondrie dans sa structure (Fig. 23), la protéine PINK1 physiologiquement est importée dans la matrice mitochondriale, où elle subit la digestion protéolytique ad œuvre des protéases spécifiques, comme la protéase PARL (pour Presenlin Associated Romboyd Like protéase) ; elle est ensuite libérée dans le cytosol pour être dégradée rapidement par le système UPS (Whitworth AJ *et al.*, 2008; Jin SM *et al.*, 2010; Deas E *et al.*, 2011).

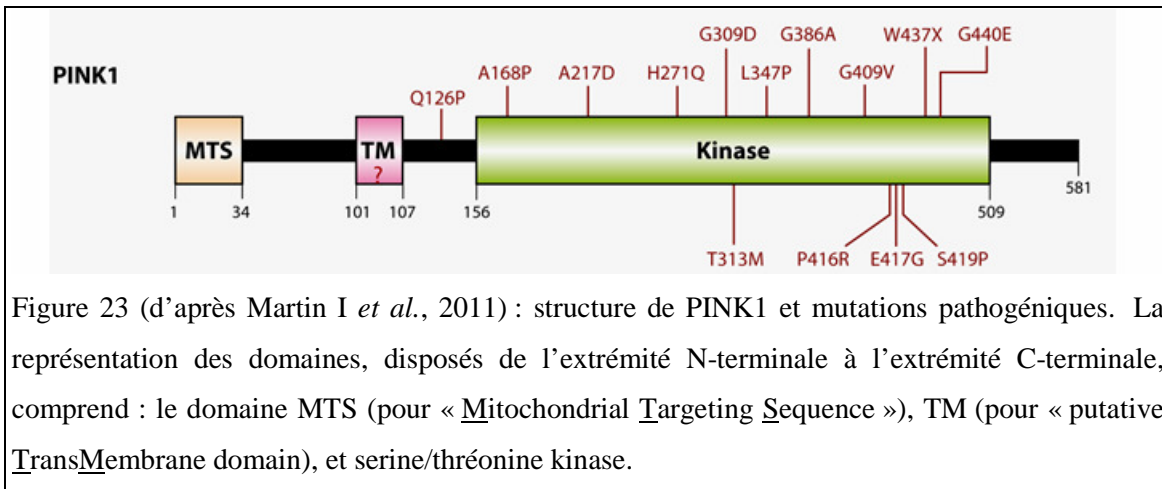


Figure 23 (d'après Martin I *et al.*, 2011) : structure de PINK1 et mutations pathogéniques. La représentation des domaines, disposés de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, comprend : le domaine MTS (pour « Mitochondrial Targeting Sequence »), TM (pour « putative TransMembrane domain), et serine/thréonine kinase.

Plusieurs études ont démontré qu'à la suite de la perte du potentiel membranaire mitochondrial, $\Delta\Psi_m$, PINK1 est stabilisé et s'accumule sur la membrane mitochondriale externe. De ce site PINK1 faciliterait le recrutement et l'activation de Parkine à la mitochondrie, étape nécessaire à la dégradation des protéines mitochondriales, la rupture de la membrane mitochondriale externe et l'activation de l'autophagie des mitochondries endommagées (Geisler S *et al.*, 2010; Narendra D *et al.*, 2008 and 2010b; Matsuda N *et al.*, 2010; Vivez-Bauza C *et al.* 2010; Seibler P *et al.*, 2011; Chan NC and Chan DC, 2011).

V.3.4 Dysfonctions synaptiques au cours de la MP

Des dysfonctions synaptiques sont documentées chez les patients atteints de MP ; par exemple, les études d'imagerie fonctionnelle ont démontré une diminution de la libération de la dopamine dans le noyau caudé (Sawamoto N *et al.*, 2008).

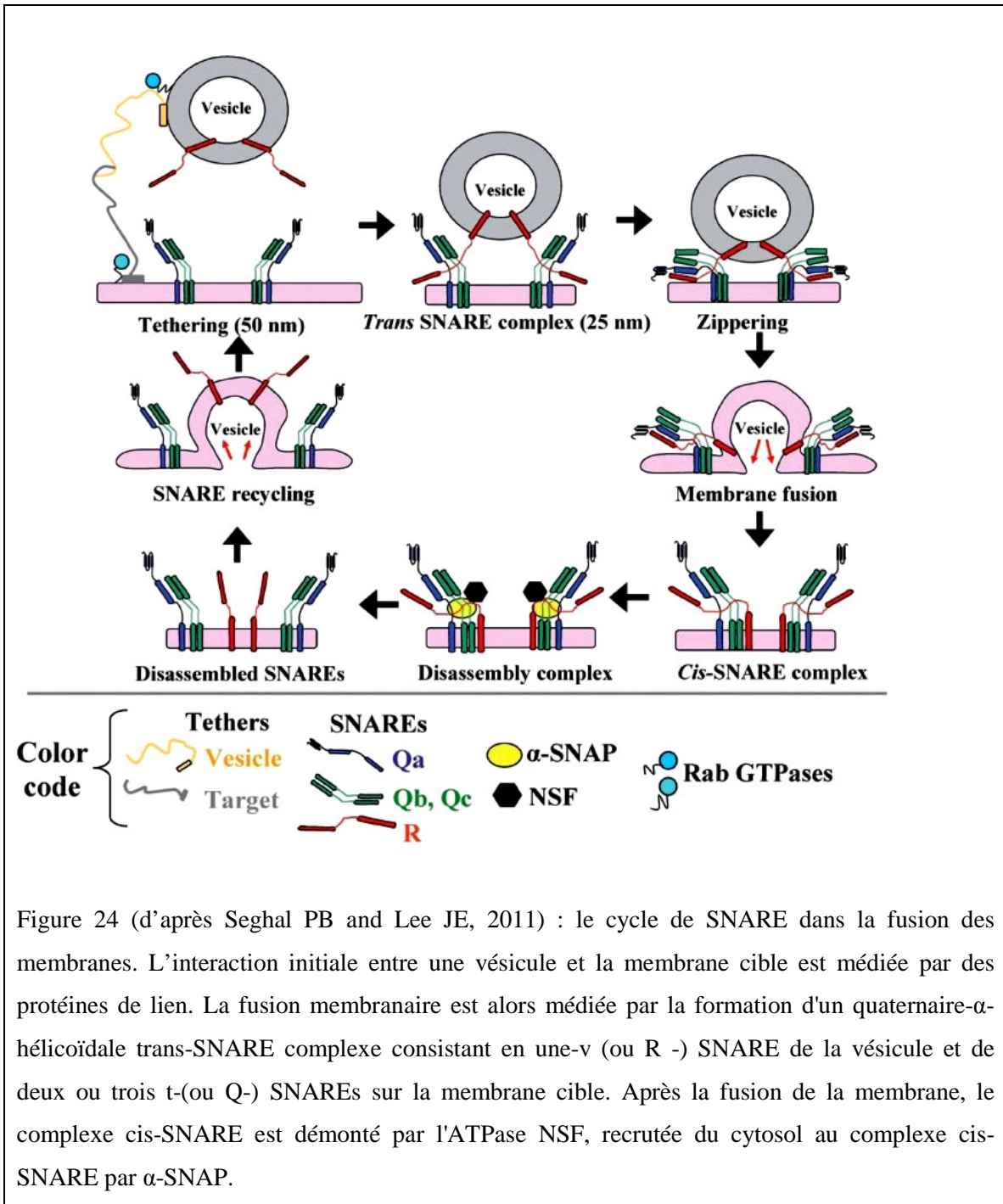
V.3.4.a L' α -synucléine, la neurotransmission et la fonction pré-synaptique

Un rôle de l' α -synucléine dans le recyclage des vésicules synaptiques, le stockage, la compartimentation et la libération des neurotransmetteurs a été soupçonné par plusieurs auteurs (Abeliovich A *et al.*, 2000; Cabin DE *et al.*, 2002; Yavich L *et al.*, 2004 et 2006; Nemani VM *et al.*, 2010). De fait il s'agit d'une protéine enrichie dans les terminaisons synaptiques et associée aux réserves de vésicules (Lavedan C, 1998; Yu S *et al.*, 2007)

A la membrane pré-synaptique l' α -synucléine interagit avec des protéines chaperonnes, comme la protéine CSP α (pour Cystein-String Protein α) et se lie à VAMP2/synaptobrevine 2, afin de promouvoir la formation et le maintien du complexe SNARE (pour Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor, formé par SNAP25, Syntaxine 1 et VAMP) (Burre J *et al.*, 2010; Chandra S *et al.*, 2005; Greten-Harrison B *et al.*, 2010).

Au niveau de la fente synaptique, l'arrivée du potentiel d'action évoque des complexes interactions protéine-protéine et de vastes changements de conformation des protéines, afin d'assurer que le recrutement, la fusion, et le recyclage des vésicules aient lieu correctement (Ungar D and Hughson FM, 2003).

Les complexes protéiques SNARE, situés sur la membrane de la vésicule (v-SNARE) et sur la membrane plasmique pré-synaptique (t-SNARE), pilotent ces processus (Fig. 24).



La protéine CSP α est critique pour l'intégrité à long terme de la synapse et pour le maintien des niveaux normaux de complexes SNARE ; ainsi les souris déficitaires de complexes CSP α exhibent une réduction significative des complexes SNARE.

Un mécanisme additionnel est représenté par la capacité de l' α -synucléine mutée d'interagir avec Rab3A. Ceci a été démontré dans le cerveau humain et des souris transgéniques (A30P). Les quatre protéines Rab 3 (A-D) sont des petites GTPases associées aux membranes des vésicules synaptiques, et jouent un rôle dans la libération des neurotransmetteurs et dans la fonction synaptique (Schluter OM *et al.*, 2004 et 2006). En conséquence de l'interaction entre l' α -synucléine mutée et Rab3A l'on observe la réduction du stockage et du transport des vésicules synaptiques (Dalfó E *et al.*, 2004a et b).

Enfin l'altération de la fonction synaptique a été mise en relation avec la capacité de l' α -synucléine d'induire la formation des agrégats, vu que *in vitro* la présence des fibrilles préformées détermine la désynchronisation des décharges neuronales (Volpicelli-Daley LA *et al.*, 2011).

Deux études témoignent du rôle de l' α -synucléine dans la neurotransmission *in vivo* dans un modèle murin invalidé pour le gène *SNCA* (α -syn $^{-/-}$). Cabin et ses collaborateurs ont observé que l'absence de l' α -synucléine cause la diminution des réserves des vésicules synaptiques et des changements dans la neurotransmission au niveau hippocampal (Cabin DE *et al.*, 2002) ; Abeliovich observe l'augmentation des réponses évoquées pour la libération de la dopamine des terminaisons pre-synaptiques, ce qui est compatible avec un rôle négatif de l' α -synucléine sur la transmission dopaminergique (Abeliovich A *et al.*, 2000).

Des données complémentaires dérivent de l'étude d'autres modèles. Seulement l'invalidation contemporaine des trois gènes codant les synucléines, α , β , et γ cause la diminution progressive et dépendante de l'âge du complexe SNARE (Burre J *et al.*, 2010) ; en revanche, la surexpression de *SNCA* récupère la perte de l'assemblage du complexe SNARE dans un modèle invalidé pour le gène codant la protéine CSP α (Chandra S *et al.*, 2005; Burre J *et al.*, 2010).

Pour ce qui concerne les autres gènes associés à la MPF, l'altération de la neurotransmission dopaminergique a été aussi constatée dans des modèles de souris

invalidés pour l'expression des gènes codant les protéines Parkine, DJ1 (Goldberg MS *et al.*, 2003 and 2005) et PINK1 (Kitada T *et al.*, 2007).

Un rôle dans la transmission synaptique, le trafic des endosomes et la croissance de neurites, a été reconnu aussi pour LRKK2 (Sakaguchi-Nakashima A *et al.*, 2007; Hatano T *et al.*, 2007; MacLeod D *et al.*, 2006). L'interaction entre LRKK2 et certaines protéines pré-synaptiques et du complexe SNARE (NSF, AP-2, SV2A, synapsine, syntaxine 1) (Piccoli G *et al.*, 2011) ou fonctionnellement corrélées à ce complexe (Rab 5b) (Shin N *et al.*, 2008) a été observée.

V.3.4.b Dysfonctions post-synaptiques

De fait au cours de la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la SNc produit une désafférentation dopaminergique dans les circuits neuronaux du striatum et par conséquent l'hyperactivation de la voie glutamatergique cortico-striée (Centonze D *et al.*, 2005). Des altérations des épines dendritiques (Anglade P *et al.*, 1996) s'associent aux changements de la signalisation glutamatergique (Picconi B *et al.*, 2004a; Calabresi P *et al.*, 2007).

L'hyperactivation des circuits glutamatergiques se reflète dans l'altération de la fonction (expression et localisation) des récepteurs NMDA du glutamate (Picconi B *et al.*, 2004b). Par ailleurs, dans un modèle de primate MP, la désafférentation dopaminergique induit un changement dans la composition en sous-unités des récepteurs NMDA striataux, spécifiquement la réduction des types NR1/NR2B mais pas des NR1 /NR2A (Hallett PJ *et al.*, 2005), liant les protéines de la PSD avec une affinité différente. La désafférentation dopaminergique provoquerait enfin une diminution du recrutement de la protéine PSD-95 (Picconi B *et al.*, 2004a). Ces études ont été effectuées sur des modèles toxiques de désafférentation dopaminergique massive.

V.3.5 Participation des protéines impliquées dans la MPF aux majeures voies de signalisation intracellulaire.

Chez la drosophile le gène *Thor*, analogue au gène humain *EIF4EBP*, a été identifié, par une approche de 'gene-screening', comme jouant un rôle de gène modificateur de la fonction de la voie PINK1/Parkine (Tain LS *et al.*, 2009). Le produit de *EIF4EBP*, la protéine 4E-BP1 est un inhibiteur de la translation et a été impliqué dans la médiation des réponses de survie cellulaire dans différentes conditions de stress (Clemens MJ 2001; Richter JD and Sonenberg N, 2005).

Effectivement, la translation cap-dépendante est réglée selon l'état de phosphorylation de la protéine 4E-BP1. La protéine 4E-BP1 est phosphorylée en conditions physiologiques, et moins affine pour le lien avec eIF4E (facteur d'initiation de la transcription eucaryote 4E). Dans ces conditions, le facteur eIF4E peut donc se lier à la structure cap à l'extrémité 5' de l'ARN messager et initier la translation cap-dépendante. Dans des conditions de stress, l'état de phosphorylation de la protéine 4E-BP1 change, déterminant en même temps la cessation de la translation cap-dépendante et l'initiation de la translation cap-indépendante. Ce dernier type de translation est nécessaire et prévaut en situations de stress.

La protéine 4E-BP1 est une des protéines effectrices principales de la voie de signalisation de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin, cible de la rapamycine des mammifères). L'activation de mTOR, par la voie PI3K/Akt est responsable de la phosphorylation de 4E-BP1 et de l'activation de la translation cap-dépendante. L'inhibition de mTOR - par la rapamycine, la privation de nutriments, l'activation de la UPR et de la réponse immunitaire - inhibe la phosphorylation de 4E-BP1 et active la translation cap-indépendante (Fig. 25).

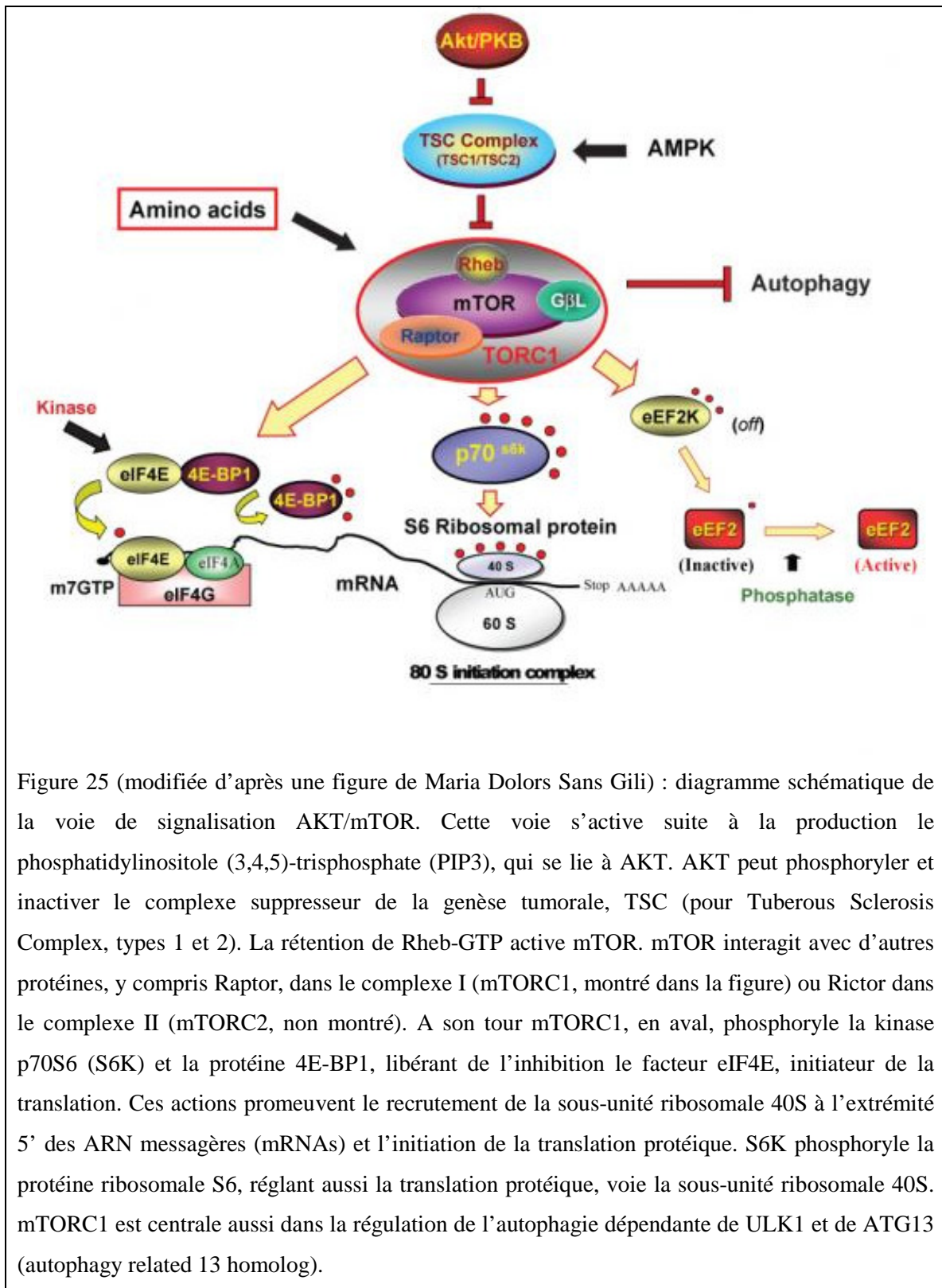


Figure 25 (modifiée d'après une figure de Maria Dolors Sans Gili) : diagramme schématique de la voie de signalisation AKT/mTOR. Cette voie s'active suite à la production le phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3), qui se lie à AKT. AKT peut phosphoryler et inactiver le complexe suppresseur de la genèse tumorale, TSC (pour Tuberos Sclerosis Complex, types 1 et 2). La rétention de Rheb-GTP active mTOR. mTOR interagit avec d'autres protéines, y compris Raptor, dans le complexe I (mTORC1, montré dans la figure) ou Rictor dans le complexe II (mTORC2, non montré). A son tour mTORC1, en aval, phosphoryle la kinase p70S6 (S6K) et la protéine 4E-BP1, libérant de l'inhibition le facteur eIF4E, initiateur de la translation. Ces actions promeuvent le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S à l'extrémité 5' des ARN messagers (mRNAs) et l'initiation de la translation protéique. S6K phosphoryle la protéine ribosomale S6, réglant aussi la translation protéique, voie la sous-unité ribosomale 40S. mTORC1 est centrale aussi dans la régulation de l'autophagie dépendante de ULK1 et de ATG13 (autophagy related 13 homolog).

Au cours de la MP, l'importance de cette voie de signalisation a été mise en évidence. Tain et ses collaborateurs ont démontré qu'il y a une interaction fonctionnelle entre la voie PINK1/Parkine et 4E-BP1. Ils montrent que la surexpression de 4E-BP1 supprime le phénotype pathologique observé au niveau des muscles (et des mitochondries de ce tissu) des modèles de drosophile invalidés pour les gènes *PARK2* et *PINK1*. Ils montrent aussi que le même effet peut être achevé par l'administration de la rapamycine, ce qui pourrait indiquer que le phénotype pathologique soit provoqué par l'altération du flux autophagique ; mais en même temps ils prouvent que l'invalidation d'un gène essentiel pour l'autophagie, *Atg5*, ne cause pas l'abolition de l'effet positif de la rapamycine. Ils concluent que cet effet protecteur est médié spécifiquement par la protéine 4E-BP1 (Tain LS *et al.*, 2009).

La protéine 4E-BP1 était déjà connue pour être un substrat de l'activité kinase de LRKK2 (Imai Y *et al.*, 2008). Par conséquent un mécanisme d'altération de la translation en conditions de stress a été suggéré en présence de mutations de LRKK2 qui normalement déterminent l'augmentation de l'activité kinase de la protéine (revu dans Martin I *et al.*, 2011).

Une interaction pourrait avoir lieu entre LRKK2, Parkine et PINK1 : la surexpression d'un mutant de *LRKK2* produisant une protéine invalidée pour son activité kinase restaure la morphologie mitochondriale et le phénotype musculaire normale chez des modèles de drosophile exprimant des mutants de *PARK2* et *PINK1* (Tain LS *et al.*, 2009).

Par son rôle de E3 ubiquitine-protéine ligase, Parkine pourrait intervenir dans d'autres voies de signalisation intracellulaire.

Son action de E3 ligase sur la Phospholipase C γ 1, PLC γ 1, revêt un intérêt particulier : la PLC γ est normalement phosphorylée et activée par plusieurs Tyrosine kinases et par Akt, à la suite de la stimulation de récepteurs EGFR (Carpenter G and Ji Q, 1999; Wang Y *et al.*, 2006). L'activation de la PLC γ , et de PLC γ 1, mène à l'hydrolyse des phosphoinositides, entraînant la formation des deux principaux seconds messagers, IP3 et DAG. IP3 provoque la libération du Ca^{2+} à partir du RE grâce à l'activation des récepteurs IP3 ; les récepteurs RyR sont également activés. Cette signalisation est essentielle dans la régulation de l'endocytose, de la différenciation cellulaire et de

l'apoptose (revu dans Rebecchi MJ and Pentylala SN, 2000), mais aussi dans la régulation de l'homéostasie intracellulaire du Ca^{2+} .

Il a été suggéré que certaines caractéristiques de l'excitabilité des neurones dopaminergiques de la SNc, seraient secondaires à une sensibilité accrue à cette voie de signalisation (Dehvari N *et al.*, 2008; Sandebring A *et al.*, 2009a).

Dans ce contexte l'action de Parkine, qui cible la PLC à la dégradation, pourrait avoir un rôle spécifique dans ce tissu.

Chapitre 2. Dysfonction mitochondriale dans la MH et la MP

VI. La fonction mitochondriale et son implication dans la MH et la MP

| | | |
|--------------|---|--------|
| VI.1 | Relevance de la mitochondrie dans la fonction neuronale | p. 142 |
| VI.2 | La mitochondrie : généralités et principales fonctions métaboliques | p. 143 |
| VI.2.1 | La respiration mitochondriale | p. 144 |
| VI.2.2 | Le cycle de Krebs | p. 147 |
| VI.2.3 | Production mitochondriale des EROs | p. 149 |
| VI.2.4 | Défauts de la phosphorylation oxydative au cours des MH et MP | p. 150 |
| VI.2.4a | Défauts de la phosphorylation oxydative au cours de la MH | p. 150 |
| VI.2.4b | Défauts de la phosphorylation oxydative au cours de la MP | p. 151 |
| | Anomalies mitochondriales causées par l' α -synucléine mutée | p. 152 |
| | Anomalies mitochondriales causées par la dysfonction de Parkine et PINK1 | p. 153 |
| VI.2.5 | La capacité mitochondriale de stockage de Ca^{2+} : contribution mitochondriale à l'excitotoxicité | p. 156 |
| VI.2.5a | Dyshoméostasie calcique mitochondriale au cours des MH et MP | p. 158 |
| VI.2.6 | Contribution mitochondriale à la neuroinflammation | p. 158 |
| VI.3 | Autres mécanismes mitochondriaux impliqués dans la MH et la MP | p. 159 |
| VI.3.1 | Régulation nucléaire de la fonction mitochondriale | p. 159 |
| VI.3.1.a | Implication de la dysfonction de PGC-1 α au cours des MP et MH | p. 161 |
| VI.3.2 | La fusion et la fission mitochondriale | p. 163 |
| VI.3.2.a | La fusion mitochondriale | p. 164 |
| VI.3.2.b | La fission mitochondriale | p. 166 |
| VI.3.2.c | Implication de la dysfonction de la fusion et fission mitochondriale au cours de la pathogénie de la MP et MH | p. 169 |
| VI.4. | La voie de signalisation Nrf2/Keap1 | p. 170 |
| VI.4.1 | Implication de la voie Nrf2/Keap1 dans la MP et MH | p. 171 |
| VI.5 | La voie PINK1/Parkine et la mitophagie | p. 171 |
| VI.5.1 | Stabilisation de PINK1 sur la membrane mitochondriale externe | p. 173 |
| VI.5.2 | Recrutement de Parkine | p. 173 |
| VI.5.3 | Activation de la mitophagie | p. 175 |

VI.1 Relevance de la mitochondrie dans la fonction neuronale

Les neurones sont des cellules hautement spécialisées dont la fonction principale est la communication. L'exercice de leurs fonctions physiologiques nécessite de grandes quantités d'énergie pour le maintien et le fonctionnement des axones, des synapses et des systèmes réglant la libération des vésicules et le recyclage des neurotransmetteurs. Le fonctionnement de ces systèmes s'appuie à son tour sur des équilibres délicats d'ions et sur le fonctionnement efficace des canaux ioniques, des récepteurs et des pompes. Ne pouvant pas utiliser la glycolyse, pour leurs besoins énergétiques les neurones dépendent fortement des mitochondries, qui leur fournissent l'énergie pour ces fonctions, sous forme d'ATP. La production d'énergie dans la mitochondrie a lieu, par le processus de la phosphorylation oxydative, au niveau de la chaîne respiratoire. En outre, grâce à leur capacité à amortir les courants transitoires de Ca^{2+} , les mitochondries jouent un rôle important à la synapse.

D'un autre côté, la mitochondrie est la principale source cellulaire de radicaux libres, ses dysfonctions représentent une cause majeure de stress. Si dans les cellules mitotiques les effets délétères des dysfonctions mitochondriales peuvent être dilués au cours des divisions cellulaires, ils endommagent irréversiblement les neurones, cellules post-mitotiques.

Il n'est donc pas surprenant qu'un lien étroit ait été suggéré entre la dysfonction mitochondriale et plusieurs maladies neurodégénératives (pour Schon and Przdeborski 2012).

VI.2 La mitochondrie : généralités et principales fonctions métaboliques

Les mitochondries sont des organites semiautonomes d'environ un micromètre.

A témoin de leur origine bactérienne, les mitochondries possèdent leur propre ADN circulaire, codant pour 13 des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, 22 ARNs de transport (ARNt) et 2 ARNs ribosomiaux (ARNr).

Elles possèdent deux membranes : la membrane externe, formée de 50% de protéines et 50% de lipides polaires, est perméable aux ions et aux petites molécules grâce à l'existence des porines ; la membrane interne, est constituée à 80% de protéines et à 20% de lipides et est imperméable. Les deux membranes délimitent un espace intermembranaire et un compartiment matriciel (Fig. 26).

La membrane interne est le siège de la chaîne respiratoire mitochondriale ; elle forme de nombreuses invaginations appelées crêtes. Cette organisation structurale, augmentant significativement l'espace disponible à héberger les complexes de la chaîne respiratoire, est important pour la capacité de la respiration mitochondriale, ainsi par exemple la diminution du nombre des crêtes cause la diminution de la capacité de la respiration.

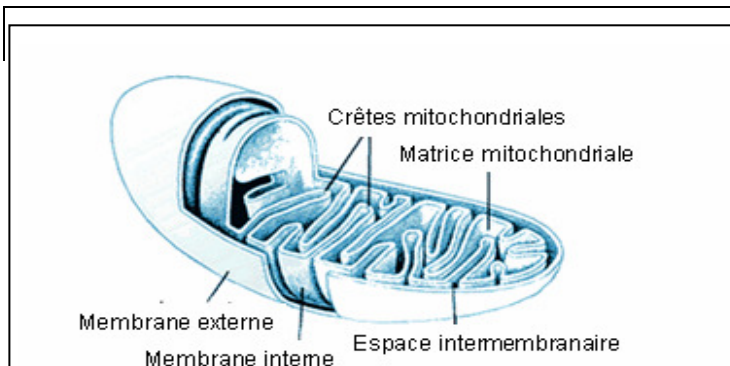


Figure 26 : structure de la mitochondrie.

VI.2.1 La respiration mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée d'un ensemble de cinq complexes multiprotéiques et deux transporteurs liposolubles (le Coenzyme Q et le cytochrome c).

La respiration mitochondriale consiste dans la réduction de l'oxygène moléculaire : ceci se fait par le transfert des électrons, en provenance des équivalents réduits NADH et FADH₂ issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides et acides aminés), à travers les complexes de la chaîne respiratoire. A ce flux d'électrons est associé le transfert actif de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Il se forme ainsi un gradient de protons qui constitue une forme d'énergie stockée comme force motrice, le potentiel de membrane mitochondriale ou $\Delta\Psi_m$. Ce gradient permet pendant la phosphorylation oxydative le couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP, à partir d'ADP et de phosphate inorganique Pi (phosphorylation) (Mitchell P, 1961) (Fig. 27). Trois des complexes de la chaîne respiratoire fonctionnent aussi comme pompes à protons pour la formation de ce gradient.

En outre au niveau de quatre complexes de la chaîne respiratoire il existe différents types de centres 'redox', pour la réduction et l'oxydation des substrats : flavines, quinones, centres fer-soufre, groupes hème et ions cupriques. Au niveau de certains de ces sites les électrons peuvent 'fuir' et entraîner la réduction monovalente de l'O₂ et la génération de radicaux libres. Les mitochondries sont responsables d'environ 90% de la production des EROs.

Complexe I, Co I ou NADH déshydrogénase- ubiquinone oxydoréductase

Le Co I est le plus gros composant protéique de la membrane interne de la mitochondrie : il possède 46 sous-unités. L'oxydation du NADH, par la NADH-déshydrogénase sur la face matricielle de la membrane, produit 2 électrons, transférés jusqu'à l'ubiquinone (CoQ). Le Co I a fonction de pompe à proton.

Complexe II, Co II ou Succinate - ubiquinone oxydoréductase

Le complexe II de la chaîne respiratoire est constitué par 4 sous-unités, codées par l'ADN nucléaire. Pendant la phosphorylation oxydative, ce complexe a une activité de succinate : ubiquinone oxydoréductase. Il catalyse la ré-oxydation du succinate en

fumarate permettant, par l'oxydation du FADH₂ et la réduction de l'ubiquinone, le transfert de 2 électrons au complexe III .

Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à un efflux de protons.

Complexe III, Co III ou ubiquinone-cytochrome c oxydo-réductase

Le Co III, constitué de 11 sous-unités, accepte les électrons des complexes en provenance des complexes I et II, transportés par les quinones libres, et à son tour le transfère au cytochrome c. Le cytochrome c relie les complexes III et IV. Comme pour le Co I, au niveau du Co III des protons sont pompés dans l'espace intermembranaire pendant le transfert d'électrons.

Complexe IV, Co IV ou cytochrome c oxydase

Le complexe IV, 13 sous-unités, catalyse la réaction d'oxydoréduction entre le cytochrome c et l'O₂ qui est réduit en H₂O par 4 électrons.

Ce transfert d'électrons, irréversible, est aussi associé au transfert de protons.

Complexe V, Co V ou ATP synthétase

L'ATP synthétase est constituée de 16 sous-unités qui forment deux parties fonctionnelles : le site catalytique F₁, et le canal de protons F_o. Au niveau de ce complexe, a lieu la conversion de la différence de potentiel électrochimique en énergie chimique ; ce processus, réversible, conduit à la production d'ATP à partir d'ADP et de Pi.

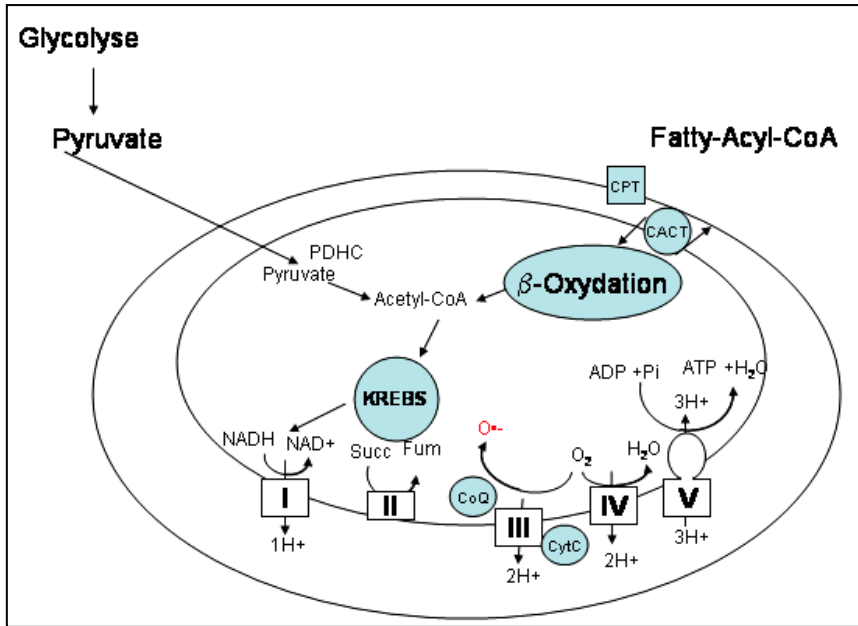


Figure 27 : diagramme représentatif de certaines des principales étapes métaboliques ayant lieu au niveau de la mitochondrie.

Ellipses: membranes externe et interne de l'organe

La membrane interne délimite l'espace matriciel siège de plusieurs voies enzymatiques. **I-V** : les cinq complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, siège de la phosphorylation oxydative. Les complexes sont localisés à la membrane interne. **KREBS** : l'espace matriciel est le siège des enzymes du cycle de KREBS. Celui-ci représente l'étape finale du catabolisme oxydatif des carbohydrates, des acides gras et des acides aminés. **Transport des acides gras activés et β -Oxydation** : étapes du catabolisme des acides gras. Les enzymes pour la dégradation des acides gras, la β -Oxydation, sont localisés dans la matrice mitochondriale. Les acides gras à chaîne courte peuvent diffuser à travers les membranes de la mitochondrie. Le début de la β -Oxydation est représenté par la formation d'une liaison thioester entre le groupe carboxyle des acides gras et le groupe thiol du coenzyme A. Les acides gras à chaîne longue, par contre, ne peuvent pas entrer directement dans la mitochondrie. Ils sont donc activés, sur la membrane externe. Ils sont ensuite transportés à la mitochondrie et dégradés.

La production des espèces réactives de l'oxygène EROs (O^*), produits toxiques qui se forment par un processus de réduction incomplète de l'oxygène, est aussi indiquée.

PDH : Complexe de la Pyruvate Dehydrogenase ; CPT : Carnytine Palmitoyl Transferase ; CACT : Carnytine Palmitoyl Transferase.

Il a été établi depuis longtemps que la concentration d'ADP extra-mitochondriale est le premier facteur qui contrôle la phosphorylation oxydative (Chance B and Williams CR, 1955). Ceci implique que l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet la sortie de

l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, contribue également à la régulation de la respiration. Toutefois, l'ADP extra-mitochondriale n'est pas le seul paramètre.

Le Ca^{2+} et le $\Delta\Psi_m$ représentent d'autres paramètres conditionnant la fonction de la chaîne respiratoire. Également la phosphorylation des complexes de la chaîne respiratoire représente un mécanisme de régulation de leur activité (Pagliarini DJ and Dixon JE, 2006; Huttemann M *et al.*, 2007; Schilling B *et al.*, 2005; Chen R *et al.*, 2004; Helling S *et al.*, 2008).

Le rendement de la phosphorylation oxydative est mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (JATP/JO).

Les NADH et FADH₂ issus du catabolisme des nutriments entrent dans la chaîne respiratoire et sont oxydés respectivement au niveau des complexes I et II.

Le FADH₂ court-circuite le Co I, la première pompe à protons de la chaîne respiratoire, par conséquent la force protomotrice générée par son oxydation est plus faible en comparaison avec la force générée par l'oxydation du NADH .

Ainsi, le rapport JATP/JO est plus faible avec le FADH₂ qu'avec le NADH.

Ceci est important lorsque on considère que le rapport NADH sur FADH₂ est respectivement de 4 lors de l'oxydation du glucose et de 2 lors de l'oxydation des acides gras.

VI.2.2 Le cycle de Krebs

Le Co II est impliqué comme succinate: ubiquinone oxydoréductase dans la chaîne respiratoire ; en même temps pour son activité de succinate déshydrogénase il est aussi un enzyme clé du cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques (Fig. 28), une série de réactions biochimiques aptes à produire des intermédiaires énergétiques qui servent à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire.

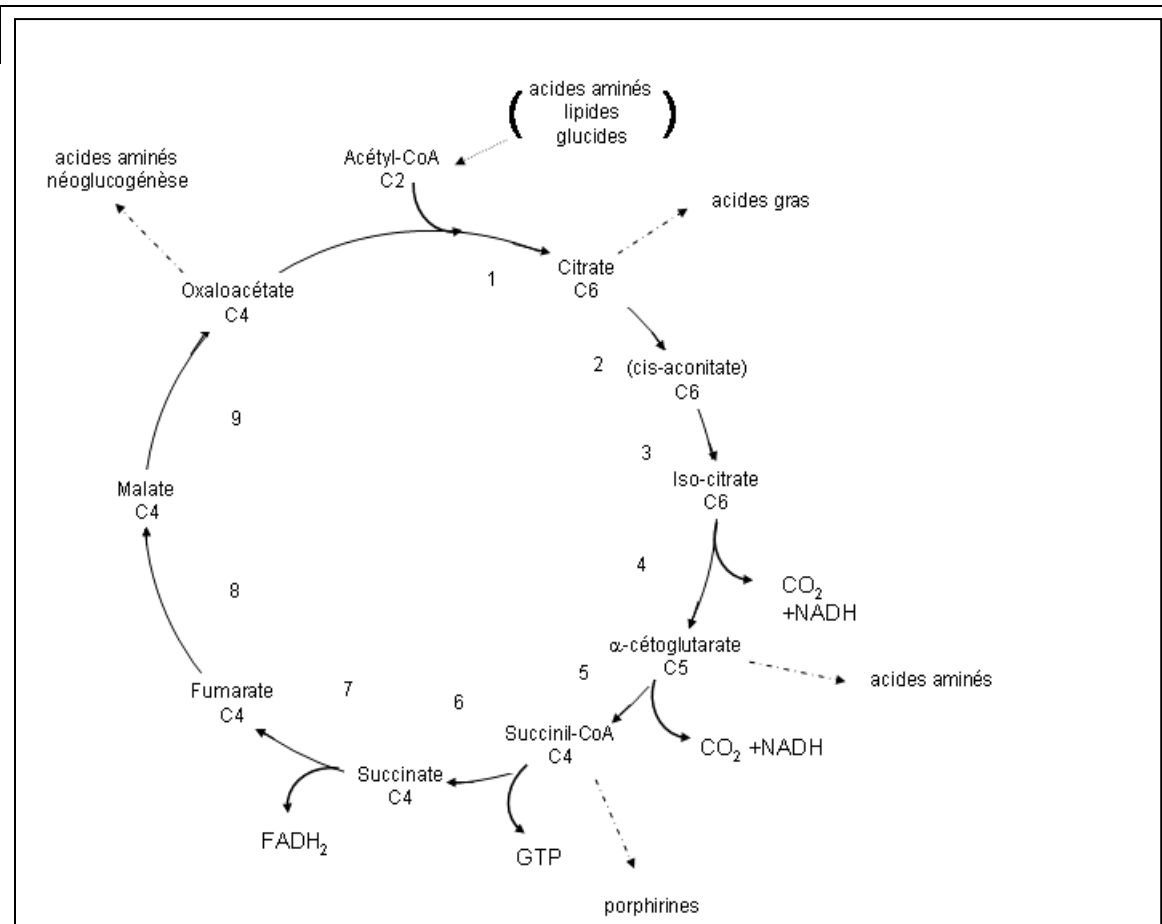


Figure 28 : diagramme représentatif du cycle de Krebs, la voie finale commune pour l'oxydation des nutriments (flèche à points) et pour la génération de précurseurs biosynthétiques (flèches à traits). Il consiste dans la condensation d'une molécule à 4 carbons (oxaloacétate) avec une molécule à 2 carbons (Acetyl-CoA). La molécule résultante, à 6 carbons (citrate), est d'abord isomérisée (formation de l'isocitrate ; la formation de l'intermédiaire cis-aconitate est indiquée) et ensuite décarboxylée deux fois, engendrant CO₂ et NADH. Ces réactions reportent à une molécule à 4 carbons, le succinyl-CoA. L'énergie libérée à la suite de la rupture du lien thioestère du succinyl CoA est stockée dans la formation du lien à haute énergie de la molécule de GTP, formée à partir du GDP et de Pi. Suivent : l'oxydation du succinate, l'hydratation du fumarate et l'oxydation du malate résultant, afin de régénérer l'oxloacétate.

Les nombres de 1 à 9 indiquent l'ordre des réactions. Les enzymes catalysant ces réactions sont respectivement 1: citrate synthase ; 2: aconitase ; 3: aconitase ; 4: isocytrate déshydrogénase ; 5: complexe de la α-cétoglutarate déshydrogénase ; 6: succinyl-CoA synthase ; 7: succinate déshydrogénase ; 8: fumarase ; 9 : malate déshydrogénase.

Dans le cycle de Krebs le Co II catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Cette réaction a un potentiel redox relativement élevé et n'est pas couplée à la réduction du NAD⁺ en NADH. De plus, la double activité du Co II est à l'origine d'un mécanisme de régulation rétroactive, très important dans la physiologie mitochondriale : lorsque le coenzyme Q est complètement réduit, les activités du Co II et du cycle de Krebs diminuent. Ce mécanisme évite l'excessive réduction du NAD⁺ à NADH et minimise la production des EROs liée au Co I et aux déshydrogénases dépendantes du NADH.

VI.2.3 Production mitochondriale des EROs

La production de radicaux libres est historiquement associée à l'activité du Co I, plus récemment la contribution du Co II dans ce processus a été explorée.

La dysfonction de ces deux complexes pourrait donc contribuer à l'augmentation des niveaux de stress oxydant qui a lieu au cours des MH et MP.

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale les sites 'redox' qui sont le siège de la 'fuite' des électrons et de la génération de O₂^{•-} sont : le site Flavine du complexe I (site I_F), le site de l'ubiquinone-réducteur du complexe I (site I_Q) et le site ubiquinol-oxydant dans le complexe III (le site III_{Q_o}) (Adam-Vizi V, 2005; Starkov AA and Fiskum G, 2003; Murphy MP, 2009). Plus récemment il a été reporté que le site Flavine du complexe II, II_F, représente un site additionnel de production de O₂^{•-} et H₂O₂; cette production serait comparable à celle reportée pour les complexes I et III classiquement considérés comme les sites de majeure production des EROs au niveau de la chaîne respiratoire (Quinlan CL *et al.*, 2012).

En plus de la chaîne respiratoire plusieurs enzymes mitochondriaux représentent des sites potentiels de production de O₂^{•-} et H₂O₂ : ils comprennent les groupes dihydrolipoate des enzymes α-Cétoglutarate déshydrogénase et pyruvate déshydrogénase, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH); entre les enzymes de la β-Oxydation, l'oxydoréductase flavoprotéine pour le transport d'électrons : Q (Electron Transport Flavoprotein : Q oxydoréductase, ETFQOR) (Bunik VI and Sievers C, 2002; Tretter L and Adam-Vizi V, 2004; Grivennikova VG *et al.*, 2010; Adam-Vizi V, 2005; Starkov AA and Fiskum G, 2003; Murphy MP, 2009).

Lorsqu'on considère le rôle des mitochondries dans le stress oxydant, il faut considérer le "cercle vicieux" qui peut s'instaurer, les mitochondries représentant à la fois la source et la cible du stress oxydant. L'ADN mitochondrial est caractérisé par une structure circulaire et sans introns et il manque d'histones ; il est localisé en proximité de la membrane interne, site de production des EROs. Ces caractéristiques expliquent la susceptibilité aux dommages provoqués par le stress oxydant ; ainsi le risque de mutations pathogéniques est statistiquement augmenté (Ames BN *et al.*, 1993; Cann RL and Wilson AC, 1983; Cortopassi GA *et al.*, 1992; Richter C *et al.*, 1988).

VI.2.4 Défauts de la phosphorylation oxydative au cours des MH et MP

Les deux maladies, la MH et la MP, ont été historiquement associées à des défauts spécifiques de la chaîne respiratoire.

VI.2.4a Défauts de la phosphorylation oxydative au cours de la MH

Des anomalies du Co II de la chaîne respiratoire au cours de la MH ont été systématiquement recherchées dans les tissus des patients et dans les modèles, cellulaires ou animaux, toxiques et génétiques, à la suite de la découverte que chez l'homme l'intoxication par le 3NP, une puissante toxine mitochondriale qui inhibe l'activité du Co II, détermine l'apparition d'un phénotype similaire à la MH, caractérisé par des dyskinésies corrélées pathologiquement à la nécrose du putamen (He F *et al.*, 1995; Ludolph AC *et al.*, 1991).

Une synthèse détaillée de ces anomalies est faite comme introduction à la section Projet I, en constituant le sujet.

VI.2.4b Défauts de la phosphorylation oxydative au cours de la MP

Les neurones dopaminergiques sont plus vulnérables aux dégâts provoqués par le stress oxydant. Plusieurs sources des radicaux libres comme le réticulum endoplasmique ou les NADPH oxydases (NOXs) peuvent avoir un rôle dans la MP (Choi DH *et al.*, 2012), mais la mitochondrie est toujours considérée la source la plus importante.

Plusieurs aspects de la physiologie mitochondriale ont été trouvés altérés chez les patients atteints ou dans les différents modèles de MP : biogenèse, homéostasie du Ca^{2+} , phosphorylation oxydative, mitophagie, morphologie et dynamique mitochondriales. Une relation entre ces mécanismes est certaine mais la question sur la séquence temporelle des défauts mitochondriaux qui contribuent à la dégénérescence au cours de la MP est toujours ouverte.

La recherche d'anomalies mitochondriales chez les patients parkinsoniens s'appuie sur l'apparition d'un syndrome parkinsonien chez les sujets utilisateurs de drogues illicites contaminées par la 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ou de pesticides (paraquat et roténone) (Langston, JW and Ballard P 1983 and 1984; Tanner CM, 1989; Snyder SH and D'amato RJ 1985; Betarbet R *et al.*, 2000). Maintenant il est reconnu que ces substances agissent effectivement comme des puissantes toxines mitochondriales inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du Co I et sont utilisées pour créer des modèles toxiques de la maladie (Greenamyre JT *et al.*, 2003; Panov AV *et al.*, 2005a; Vila M and Przedborski S, 2003; Przedborski S, 2004).

En effet, dans la SNc l'activité et les niveaux d'expression des protéines du Co I sont diminués (Schapira AH *et al.*, 1989; Schapira AH *et al.*, 1990; Hattori N *et al.*, 1991). Mais ce défaut peut concerner les autres tissus cérébraux, comme le cortex et le striatum (Mizuno Y *et al.*, 1989; Parker WD *et al.*, 2008), et les tissus non cérébraux, comme les fibroblastes (Mytilineou C *et al.*, 1994), les plaquettes (Krieger D *et al.*, 1992; Haas RH *et al.*, 1995) et, de façon variable, le muscle squelettique (Blin O *et al.*, 1994) et les lymphocytes (Yoshino H *et al.*, 1992; Haas RH *et al.*, 1995) des patients atteints.

Comme on l'a vu dans la section spécifique dédiée au stress oxydant, la diminution de l'activité de Co I est considérée comme une sources majeure de EROs ; cependant, en

cercle vicieux, l'augmentation du stress oxydant peut endommager l'ADN mitochondrial et par conséquent augmenter le taux des mutations spontanées, et modifier directement l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet l'oxydation de sous-unités catalytiques du Co I a été observée chez les mitochondries isolées des cerveaux des patients atteints de MP (Keeney PM *et al.*, 2006). Ces défauts sont vraisemblablement imputables à un défaut de l'ADN mitochondrial, vu qu'ils se reproduisent dans un système d'hybrides cytoplasmiques (cytoplasmic hybrids, cybrids) contenant l'ADN mitochondrial des patients MP (Swerdlow RH *et al.*, 1996; Swerdlow *et al.*, 2001). Plusieurs auteurs ont exploré la présence d'altérations de l'ADN mitochondrial chez les patients atteints de MP (Vivez-Bauza C *et al.*, 2002; Bender A *et al.*, 2006) ; en effet une fréquence plus haute de délétions somatiques de l'ADN mitochondrial a été révélée chez ces patients, par rapport aux sujets de contrôle (Bender A *et al.*, 2006).

L'étude des patients avec des mutations dans les gènes impliqués dans les formes monogéniques de MPF, ainsi que l'étude des modèles animaux ou cellulaires de MPF a confirmé que des défauts de la phosphorylation oxydative se produisent au cours de la pathogénie de la maladie. Selon le modèle utilisé on peut retrouver un défaut spécifique et isolé d'un complexe de la chaîne respiratoire, plus souvent le Co I, de la production d'ATP, du $\Delta\Psi_m$. Plus souvent la combinaison de plusieurs de ces défauts est observable, comme un effet des mécanismes de corégulation mis en place par la mitochondrie.

Dans les modèles étudiés, ces défauts sont souvent associés à l'augmentation des niveaux du stress oxydant et/ou de la susceptibilité aux toxines et aux facteurs de stress (pour revue Trancikova A *et al.*, 2011b).

Anomalies mitochondriales causées par l' α -synucléine mutée

Au cours de la MP, la formation d'agrégats et la démise mitochondriale sont réputées être inter-liées et complémentaires (Kowall NW *et al.*, 2000). Ainsi un rôle de l' α -synucléine dans la régulation de la fonction mitochondriale a pu être observé dans différents modèles.

L'accumulation de α -synucléine au niveau de la membrane interne des mitochondries a été décrite dans le striatum des patients atteints de MP (Devi L *et al.*, 2008), ou dans

différentes régions cérébrales (Nakamura K *et al.*, 2008; Shavali S *et al.*, 2008; Zhang L. *et al.*, 2008). Cette accumulation s'associe à un défaut spécifique du Co I de la chaîne respiratoire, à l'augmentation de la production des EROs (Devi L *et al.*, 2008) et de la fission mitochondriale (Nakamura K *et al.*, 2011). D'autres défauts de la phosphorylation oxydative sont observables dans les différents modèles étudiés. Par exemple l'accumulation de la protéine mutée (A53T) dans la mitochondrie peut s'associer à la dégénérescence mitochondriale, au dommage oxydatif de l'ADN mitochondrial et au défaut du Co IV (Martin LJ *et al.*, 2006).

Il a été très récemment proposé que l'endonucléase pro-apoptotique mitochondriale Endo G pourrait être un exécuteur en aval de la toxicité médiée par l'a-synucléine mutée (Buttner S. *et al.*, 2013). Buttner et collaborateurs confirment que l'a-synucléine exogène se retrouve associée à la mitochondrie et démontrent dans des modèles de drosophile et de *c. elegans* que l'invalidation de la fonction de EndoG par une stratégie de inhibition de l'ARN prolonge la survie des mouches transgéniques.

Anomalies mitochondriales causées par la dysfonction de Parkine et PINK1

Des preuves du rôle de **Parkine et PINK1** dans la régulation de la physiologie mitochondriale dérivent de l'étude des modèles de drosophile invalidés pour la fonction des deux protéines. Dans ces modèles les défauts mitochondriaux dans les tissus à haute demande énergétique, y compris les tissus germinaux masculins et les muscles des ailes, sont dramatiques. Surtout dans les muscles des ailes les mitochondries se présentent dégénérées avec des crêtes fragmentées et gonflées. Ces modifications précèdent la mort cellulaire apoptotique (Pesah Y *et al.*, 2004; Greene J *et al.*, 2003; Clark IE *et al.*, 2006, Park J *et al.*, 2006; Yang Y *et al.*, 2006). La description de ces altérations ultrastructurelles a constitué la base pour la découverte d'une voie fonctionnelle PINK1/Parkine impliquée dans la mitophagie, mais aussi un point de départ pour mettre en évidence un nombre d'autres défauts bioénergétiques causés par la dysfonction des deux protéines, chez la drosophile et autres modèles. Le tableau suivant (Tableau 5) résume les études les plus importantes qui ont exploré la relation entre la fonction des protéines Parkine et PINK1 et la démise bioénergétique mitochondriale.

| Modèle | Défauts décrits | Référence | |
|------------------------------|--|--|--|
| Fibroblastes Humaines | Parkine (délétion exons 2/2 ; point mut/ point mut) | ↓ Respiration et activité CoI # ↓ $\Delta\Psi$; ↓ ATP | Mortiboys H, 2008 |
| | Parkine (délétions exons 2-3/2) | ↓ Respiration CoI et IV * ↓ quantité complexes (BN) ↓ ATP (inhibition glycolyse) Péroxydation lipidique (TBARS) | Pacelli C, 2011 |
| | PINK1 (W437X ↓ activité Kinase) | ↓ Respiration CoIV ↓ ATP (gala) ; ↓ Cyt c ↑ Radicaux libres | Piccoli C, 2008 |
| Leucocytes Humains | Parkine (délétions exons 4-8/4-8; mut ex 8/del ex 2-5) | ↓ activité CoI | Muftuoglu M, 2004 |
| | PD Idiopathique | ↓ activité CoI et IV | |
| Drosophila | Parkine | Apoptose* Apoptose *# | Greene J, 2003 Pesah Y, 2004 |
| | PINK1 | ↓ ATP*# ↓ ATP * Apoptose * ↓ Respiration CoI et activité CoI | Clark IE, 2006 Yang Y, 2006 Park J, 2006 Morais V, 2009 |
| Zebrafish | Parkine | ↓ activité CoI # | Flinn L, 2009 |
| | PINK1 | ↑ Radicaux libres # | Anichtchik, O, 2008 |
| C. elegans | Parkine | # | Ved R 2005 |
| | PINK1 | #* | Samann J, 2009 |
| Souris | Parkine | ↓ Respiration CoI, II et IV et découplée * Modifications CoI et IV (protéome) Péroxydation lipidique (4HNE) et protéique (carbonyles) ↓ Acide urique (anty-oxydant) | Palacino J, 2004 |
| | Parkine | ↓ Respiration découplée * | Stichel CC, 2007 |
| | PINK1 | * mito + grandes ↓ Respiration CoI, II, âge-dépendante ↓ activités CoI et II, sensibilité au choc thermique et à l'H ₂ O ₂ | Gautier C, 2008 |
| Cellules et Neurones | PINK1 | ↓ $\Delta\Psi$; # ↑ Radicaux libres ; ↓ $\Delta\Psi$; ↓ Glutathione | Exner N, 2007 Wood-Kaczmar A, 2008 |
| | | ↓ $\Delta\Psi$ | Morais V, 2009 |
| MEFs | PINK1 | ↓ $\Delta\Psi$; ↓ ATP; ↓ croissance en galactose ↑ Radicaux libres (pas due à la fuite de protons); # ↓ $\Delta\Psi$ | Amo T 2011 Morais V, 2009 |

* Altérations ultrastructurelles des mitochondries

Sensibilité accrue aux toxines mitochondriales

Tableau 5: Résumé des défauts de la phosphorylation oxydative relevés dans les différents modèles de MPF associée à l'altération de la fonction de Parkine et PINK1.

Le rôle protecteur des protéines Parkine et PINK1 émerge de ces études, où les défauts spécifiques de la chaîne respiratoire apparaissent à la suite de l'invalidation ou de l'introduction des mutations dans les deux gènes.

D'autre part, il a été suggéré que Parkine pourrait être une protéine cible du facteur de transcription p53 et jouer un rôle comme commutateur moléculaire de l'effet Warburg : son expression serait augmentée *in vitro* suite à la surexpression de p53 et serait corrélée à l'augmentation de la respiration mitochondriale (Zhang C *et al.*, 2011). De manière spéculaire, il a par exemple été montré que Parkine module positivement l'expression du Co I (Kuroda Y *et al.*, 2006).

De plus d'autres études montrent la fonction cytoprotectrice de Parkine envers plusieurs types de toxines mitochondriales (Darios F *et al.*, 2003; Hyun DH *et al.*, 2005; Casarejos MJ *et al.*, 2006; Rosen KM *et al.*, 2006; Vercaemmen L *et al.*, 2006; Henn IH *et al.*, 2007; Manfredsson FP *et al.*, 2007; Paterna *et al.*, 2007).

En ce qui concerne PINK1, l'interaction avec ses substrats pour la phosphorylation comme TRAP1 (pour TNF Receptor-Associated Protein 1), un chaperon mitochondrial connu aussi comme Hsp75, et HtrA2/Omi pourrait expliquer son rôle dans la régulation de la physiologie mitochondriale. L'altération de la phosphorylation de ces substrats est associée à l'augmentation du stress mitochondrial (Pridgeon JW *et al.*, 2007; Plun-Favreau H *et al.*, 2007).

En effet ces études mettent en évidence que l'invalidation de la fonction des gènes impliqués dans la MPF affecte la fonction mitochondriale.

Cependant la question concernant un impact spécifique sur la fonction du Co I reste toujours ouverte. Par exemple WS Choi et ses collaborateurs montrent *in vitro* que l'absence du Co I ne suffit pas à déclencher la mort des neurones dopaminergiques et, comparant l'effet de deux inhibiteurs du Co I, la pieracidine et la roténone, ils attribuent à la déstabilisation du système microtubulaire, et à l'accumulation de la dopamine et des produits toxiques de son métabolisme qui en dérivent, la toxicité sélective de la roténone (Choi WS *et al.*, 2011).

De plus il a été montré *in vitro* que l'invalidation de *PINK1* cause l'augmentation de la production des EROs par les NOXs, une autre source majeure de stress oxydant (Gandhi S *et al.*, 2009).

VI.2.5 La capacité mitochondriale de stockage de Ca^{2+} : contribution mitochondriale à l'excitotoxicité

Grâce à la présence de plusieurs systèmes de régulation de la concentration intramitochondriale du Ca^{2+} , la mitochondrie joue un rôle de système tampon de la concentration de Ca^{2+} au cours de la neurotransmission (Fig. 29) ; pour ça elle est considérée un des systèmes médiateurs des mécanismes d'excitotoxicité indirecte.

Les mitochondries interviennent lorsque la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme dépasse un certain seuil (0.3–1 μM selon les tissus, le type cellulaire et l'état fonctionnel de la cellule), activant leurs systèmes d'import de Ca^{2+} .

Les mitochondries peuvent stocker de grandes quantités de Ca^{2+} dans l'espace de la matrice ; du phosphate inorganique est accumulé, en même temps que le Ca^{2+} , ce qui fait précipiter le Ca^{2+} en excès et donne lieu à des dépôts d'hydroxyapatite amorphe dans la matrice. Ce mécanisme protège la mitochondrie des changements dangereux de la concentration osmotique, qui autrement provoqueraient sa rupture. En effet, lorsque leur capacité de stockage du Ca^{2+} est excédée, les mitochondries, diminuant leur $\Delta\Psi_m$ et activant le Pore de Transition de la Membrane Mitochondriale (Permeability Transition Pore, PTP) favorisent le relais de Ca^{2+} .

L'état d'ouverture du PTP, à basse ou à haute conductance est important pour l'homéostasie du Ca^{2+} (Ichas F and Mazat JP, 1998) et pour la physiologie neuronale et cellulaire. Par exemple en conditions physiologiques la propagation des ondes de Ca^{2+} provoquées par la dépolarisation neuronale peut causer l'ouverture à basse conductance du PTP (Oster AM *et al.*, 2011) ; en revanche l'ouverture du PTP à haute conductance entraîne en cercle vicieux l'ultérieure surcharge de Ca^{2+} cellulaire. L'activation excessive du PTP contribue de manière essentielle aux mécanismes de excitotoxicité responsables des phénomènes de dégénérescence observés au cours des plusieurs maladies neurodégénératives.

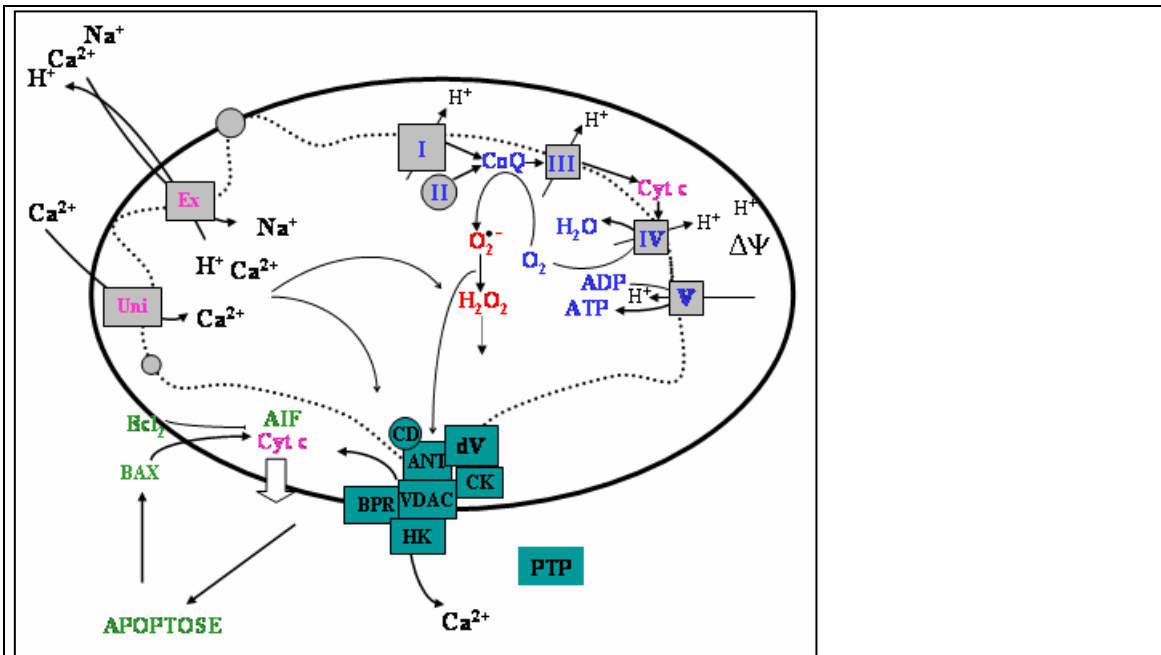


Figure 29 : schéma d'une partie des mécanismes de régulation de la concentration du Ca^{2+} dans la mitochondrie. (Non mentionnés le « Mitochondrial Ryanodine Receptor » **MRYR**, système d'importation du Ca^{2+} , et le « Sodium, Calcium extrusion pathway » **NCX1**).

L'uniporteur du Ca^{2+} (**Uni**) et les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (**Ex**) représentent des mécanismes pour l'import du Ca^{2+} . Le **PTP**, « Permeability Transition Pore » ou pore de perméabilité de transition, un complexe multiprotéique constitué de protéines localisées à la membrane externe, interne ou dans la matrice, représente un mécanisme pour l'extrusion du Ca^{2+} , qui s'active lorsque la capacité calcique est dépassée. $\Delta\Psi$: le gradient de protons qui se forme dans l'espace intermembranaire à la suite du passage des électrons pendant la phosphorylation oxydative représente un mécanisme de régulation pour l'activation du PTP. L'activation excessive du PTP conduit à la perte du potentiel de membrane $\Delta\Psi$, à la libération des facteurs pro-apoptotiques et déclenche la mort cellulaire. D'autre part, le défaut du maintien $\Delta\Psi$ représente un stimulus pour déclencher l'apoptose.

Les protéines composantes du PTP sont indiquées : dV, dimères du CoV (Giorgio V *et al.*, 2013) ; CD, Cyclophline D ; VDAC pour « Voltage Dependent Anion Channel » ; ANT, pour « Adenine Nucleotide Translocator » ; HK, Hexkinase ; BPR, pour « Benzodiazepine Receptor ».

En réponse à l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} , la production EROs et des ERAs est aussi augmentée.

Les ERAs en excès entraînent la nitrosylation des récepteurs de la Ryanodine, RyRs qui, altérés, augmentent ultérieurement la libération de Ca^{2+} de l'ER (Hidalgo C *et al.*, 2005). De même, la production de EROs peut modifier les récepteurs InsP3R.

VI.2.5a Dyshoméostasie calcique mitochondriale au cours des MH et MP

Au cours de la MH, la HTT mutée est retenue responsable de la baisse de la capacité mitochondriale de retenir le Ca^{2+} . Par un mécanisme d'interaction directe avec la membrane mitochondriale externe, la HTT mutée, mais pas la sauvage, entraînerait la diminution de la capacité mitochondriale de rétention du Ca^{2+} (Panov A *et al.*, 2002, Choo YS *et al.*, 2004). L'uniporteur du Ca^{2+} mitochondrial (Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter, MCU) pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme, vu que l'utilisation de son inhibiteur, la molécule Ru360, protège les MSNs des souris transgéniques des phénomènes d'excitotoxicité glutamatergique (Tang TS *et al.*, 2005).

A ce jour pas beaucoup d'auteurs ont caractérisé la capacité mitochondriale de stockage du Ca^{2+} au cours de la MP, même si son rôle au cours de la pathogénie de la maladie est presque indiscutable à cause des caractéristiques des neurones dopaminergiques atteints, dont l'activité basale dépend des canaux du Ca^{2+} type L (Long Lasting) 1,3 (Chan CS *et al.*, 2007). Le défaut de la capacité mitochondriale de stockage du Ca^{2+} a été observé *in vitro* après invalidation de l'expression de *PINK1*. Ce défaut a été attribué à une dysfonction de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Gandhi S *et al.*, 2009).

VI.2.6 Contribution mitochondriale à la neuroinflammation.

Dans une section précédente on a vu comment au cours de la neurodégénérescence, la prolifération et l'activation des cellules gliales conduit à l'activation des enzymes tels que les iNOS et les NOXs, et contribue à l'augmentation de la production mitochondriale et non mitochondriale et des EROs et ERAs.

Récapitulatif, les mitochondries gliales représentent pour les neurones une source délétère additionnelle de stress oxydant ; d'autre part les mitochondries (neuronales et gliales) sont la cible du stress oxydant, et en cercle vicieux, une fois endommagées elles contribuent au maintien de niveaux élevés de stress oxydant.

VI.3 Autres mécanismes mitochondriaux impliqués dans la MH et la MP

D'autres aspects de la fonction mitochondriale sont importants au cours de la pathogénie des MH et MP comme i) la biogenèse et la transcription, considérées comme des fonctions de deux génomes, nucléaire et mitochondriale, ii) la dynamique mitochondriale, soit l'équilibre entre la fusion et la fission mitochondriale et iii) la mitophagie.

Des approfondissements sur ces aspects sont compris dans les paragraphes suivants.

VI.3.1 Régulation nucléaire de la fonction mitochondriale

Etant des organites semiautonomes et limités dans la capacité de coder pour leurs propres protéines, les mitochondries dépendent pour la production des protéines restantes - la majorité - du génome nucléaire.

Essentiellement, des facteurs de transcription nucléaires règlent la réplication de l'ADN mitochondriale et la transcription de gènes codant pour les composantes mitochondriales de toutes catégories.

Ces facteurs de transcriptions comprennent les facteurs nucléaires respiratoires, NRF-1 et NRF-2, et les protéines appartenant aux superfamilles de Récepteurs Nucléaires, NRs (pour Nuclear Receptors) : PPARs (pour Peroxisome Proliferator Activated Receptor) et ERR α (pour Estrogen Related Receptors) (Lin J *et al.*, 2005; Scarpulla RC *et al.*, 2012). Les PPARs (trois isoformes α , β , et γ) sont impliqués dans le contrôle transcriptionnel des enzymes mitochondriaux députés à la β -Oxydation (Madrazo JA and Kelly DP, 2008). Les ERRs (trois isoformes α , β , et γ), contrôlent les gènes impliqués dans tous les aspects du métabolisme mitochondrial (Eichner LJ and Giguere V, 2011), y compris les enzymes de la β -Oxydation qui sont sous le contrôle des PPARs (Dufour CR *et al.*, 2007). En outre, ERR α peut régler la transcription du gène codant pour le même PPAR α (Andersson U and Scarpulla RC, 2001).

PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α ; PPAR γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ), est un co-activateur de la transcription très versatile. PGC-1 α forme des complexes hétéromères avec les autres facteurs de transcription (Fig. 30).

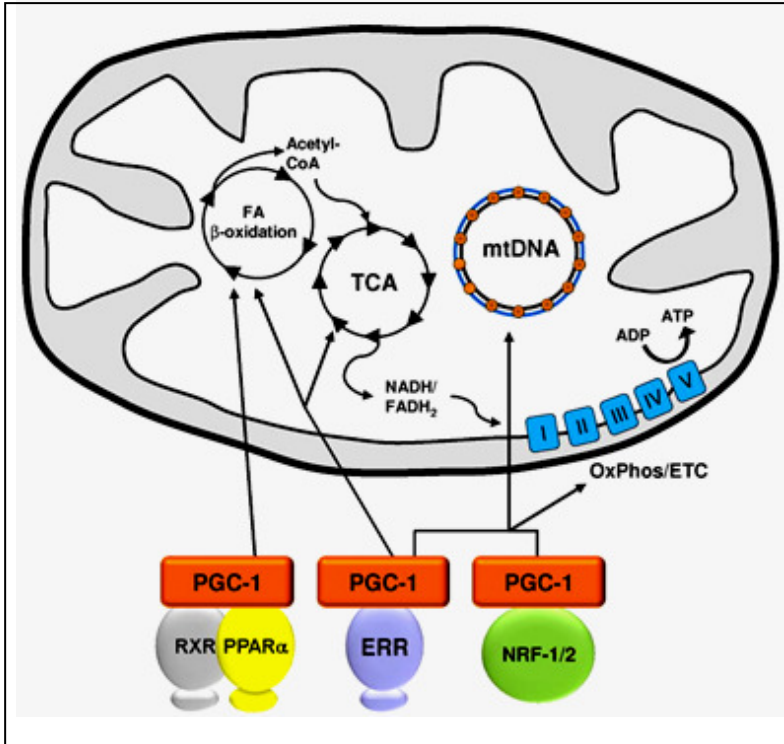


Figure 30 (d'après Scarpulla CR *et al.*, 2012) : interaction entre les co-activateurs de la famille PGC-1 et les facteurs de transcription spécifiques, orchestrant les fonctions mitochondriales d'importance primaire, y compris la β-Oxydation, le cycle de KREBS ou des acides tricarbossiliques (TCA), la répllication de l'ADN mitochondrial et la biogenèse de l'organe, la phosphorylation oxydative /

chaîne respiratoire (OxPhos/ETC ; ETC pour Electron Transport Chain). PPARα interagit avec son partner, le récepteur rétinolide X (RXR), dans le contrôle de l'expression d'une grande partie des enzymes de la β-Oxydation pour les acides gras (FA pour Fatty Acids). Les facteurs NRF-1 et NRF-2 contribuent au maintien de l'ADN mitochondrial et à l'expression de plusieurs protéines de la chaîne respiratoire. Les récepteurs de la famille des ERR (pour Estrogen Related Receptors) règlent l'expression de facteurs nécessaires à toutes les fonctions mitochondriales.

Ainsi, PGC-1α représente le facteur qui permet l'intégration des voies de signalisation : il est impliqué dans la biogenèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs, les défenses antioxydants, la thermogenèse adaptative, le métabolisme du glucose et des acides gras, la composition en fibres dans le muscle squelettique - soit la régulation de la proportion entre fibres avec un métabolisme oxydatif (types I et II) et les fibres pauvres en mitochondries, à métabolisme glycolytique (types II X et II B) - et la contractilité du muscle cardiaque (Arany Z *et al.*, 2005; Puigserver P and Spiegelman BM, 2003; Liang H ad Ward WF, 2006; St-Pierre J *et al.*, 2006; Kelly DP and Scarpulla RC, 2004; Handschin C and Spiegelman BM, 2006).

Surtout, PGC-1α stimule la respiration mitochondriale : par exemple, les gènes codant pour le cytochrome c et pour la majorités des sous-unités des complexes I-V, ainsi que le

gène codant pour le facteur de transcription mitochondriale A (Tfam pour Transcription factor a mitochondrial) sont réglés par cette voie. En outre PGC-1 α induit l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hème, le transport d'ions, l'import et la traduction de protéines (Lin J *et al.*, 2002; St-Pierre J *et al.*, 2003; Wu Z *et al.*, 1999).

VI.3.1.a Implication de la dysfonction de PGC-1 α au cours des MP et MH

Cette implication a été suggérée pour les deux maladies, la MP et la MH.

La meta-analyse de 9 études GWAS et des 185 études de transcriptomes a révélé que, entre les groupes fonctionnels des gènes (« gene set ») analysés, l'expression des gènes réglés par PGC-1 α est diminuée dans les tissus cérébraux des patients MP (Zheng B *et al.*, 2010). Plus récemment il a été montré qu'un nouveau substrat de Parkine, PARIS (PARKin Interacting Substrate), intervient comme un régulateur négatif de la transcription de PGC-1 α . PARIS est trouvé accumulé dans les cerveaux des patients atteints de MP et des souris Parkine KO (Shin JH *et al.*, 2011). Toutefois, la transcription PGC-1 α n'est pas diminuée dans les fibroblastes dérivés des patients avec des mutations dans le gène *PARK2* qui au contraire exhibent une augmentation de ses niveaux d'expression accompagnée par une diminution de la transcription des gènes en aval, comme GPX1, SOD2, NRF 1 et 2, TFAM, ATPase b et COX II (Pacelli C *et al.*, 2011). Ces résultats sont compatibles avec l'altération de l'activité de PGC-1 α , possiblement causée par des modifications post-traductionnelles (Canto C and Auwerx J, 2009).

Historiquement le rôle de PGC-1 α dans la MH a été soupçonné depuis que la première caractérisation des souris knock-out PGC-1 α a démontré des dysfonctions mitochondriales et bioénergétiques associées à des troubles du mouvement de type hyperkinétique et à de la dégénérescence striatale, anomalies qui rappellent le phénotype de la MH (Lin J *et al.*, 2004; Leone TC *et al.*, 2005).

D'après ces premiers travaux, Cui a démontré la diminution des niveaux de PGC-1 α i) *post mortem*, dans le striatum des patients MH, ii) *in vivo*, dans les MSNs d'un modèle de souris transgéniques MH et iii) *in vitro*, sur une lignée de cellules striatales dérivée de ces souris. Cui a aussi fourni la preuve que l'augmentation des niveaux de PGC-1 α améliore l'atrophie des neurones du striatum dans ce modèle (Cui L *et al.*, 2006).

En contemporaine, Weydt a observé que l'expression striatale des gènes réglés par PGC-1 α , y compris les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, est fortement réduite au cours de la MH (Weydt P *et al.*, 2006).

Depuis ces premières observations, un grand nombre d'études a vérifié l'hypothèse d'un rôle de PGC-1 α dans la pathogénie de la MH (Pour une revue Chaturvedi RK and Beal MF, 2013).

La HTT mutée pourrait, par interaction directe altérer la capacité de PGC-1 α de co-activer la transcription des gènes cibles en aval, ou, interférant avec la plateforme transcriptionnelle CREB/TAF4 sur le promoteur du gène, réprimer la transcription de PGC-1 α (Cui L *et al.*, 2006; et pour une revue McGill JK and Beal MF, 2006) (Fig. 31).

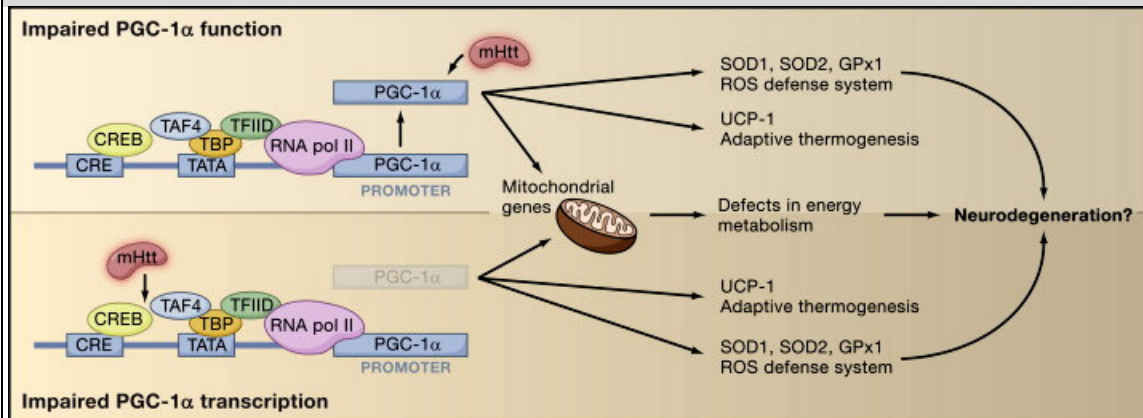


Figure 31 (d'après McGill JK and Beal MF, 2006) : mécanismes proposés pour une action de la HTT mutée sur la fonction (en haut) ou l'expression (en bas) de PGC-1 α au cours de la MH.

Haut : au cours de la MH, P Weydt (2006) a montré que la HTT mutée affecte l'expression des gènes en aval de PGC-1 α . Toutefois il manqué toujours une preuve de l'interaction directe entre la HTT mutée et PGC-1 α . Bas : L. Cui (2006) a montré que l'association de la HTT mutée avec le complexe CREB/TAF4 sur le promoteur de PGC-1 α interfère avec la transcription, et par conséquent l'activité de PGC-1 α . La HTT mutée pourrait régler l'activité de PGC-1 α avec différents mécanismes, selon le tissu. La dysfonction de PGC-1 α affecte l'expression des gènes réglés en aval et détermine l'apparition des anomalies de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique, contribuant à la dégénérescence des neurones susceptibles. En même temps le défaut de PGC-1 α affecte les enzymes des systèmes antioxydants, SOD1, SOD2, et GPx1, et détermine l'augmentation des taux de stress oxydant (St-Pierre J *et al.*, 2006)

D'autres mécanismes proposés pour expliquer la diminution de l'expression des gènes cibles de PGC-1 α sont : la répression, de la part de la HTT mutée, de TORC1 (pour Transducer Of Regulated CREB binding proteins, 1) le plus puissant coactivateur de PGC-1 α (Chaturvedi RK *et al.*, 2012) et l'augmentation de l'activité transglutaminase de la HTT mutée (McConoughey SJ *et al.*, 2010).

VI.3.2 La fusion et la fission mitochondriale

Les mitochondries sont des organites dynamiques. Ils forment un réseau tubulo-vésiculaire tout au long de la cellule. Ils ont la possibilité de fusionner, diviser, et de migrer pour fournir l'énergie tout au long des processus neuronaux (Hoppins S *et al.*, 2007; Bereiter-Hahn J *et al.*, 2008; Benard G and Karbowski M, 2009; Otera H and Mihara K, 2011).

Par les mécanismes de fusion et fission, les mitochondries accomplissent d'autres fonctions dans la cellule, qui sont par exemple importantes pour la distribution des mitochondries dans toutes les cellules en division, vu que les mitochondries ne peuvent pas être créées de novo.

La fission est aussi un processus asymétrique, à la suite duquel des mitochondries fortement dépolarisées se produisent, en plus des mitochondries saines. Au cours du développement embryonnaire et de la plasticité neuronale la ségrégation des ces mitochondries aux cellules en division détermine leur destin (Cho DH *et al.*, 2010; Nunnari J and Suomalainen A, 2012), les cellules accumulant un plus grand nombre de mitochondries dépolarisée étant destinées à l'élimination.

La division asymétrique représente aussi un mécanisme de protection contre le stress cellulaire, afin d'isoler les mitochondries dysfonctionnelles ou des segments endommagés du réseau et promouvoir leur dégradation par la voie de l'autophagie (Twig G *et al.*, 2008). Lorsque ces mécanismes de contrôle de qualité de la mitochondrie ne peuvent pas se mettre en œuvre correctement, la fission mitochondriale peut promouvoir l'apoptose (Suen DF *et al.*, 2008).

Des cycles de fusion et fission mitochondriale permettent l'échange et la redistribution de métabolites, de ions, ainsi que de protéines et de molécules d'ADN mitochondrial, en permettant la complémentation et la recombinaison des molécules d'ADN et la réparation

des dysfonctions mitochondriales. D'une autre part, la fusion mitochondriale augmentant la surface des crêtes mitochondriales, augmente significativement l'espace disponible à héberger les complexes de la chaîne respiratoire; augmentant la capacité de la respiration mitochondriale, ce mécanisme devient essentiel en conditions de stress, vis-à-vis de la survie cellulaire. Dans une vision d'ensemble, les cycles de fusion et fission mitochondriales visent à moduler la fonction mitochondriale selon les besoins en énergie de la cellule.

Un groupe de grands GTPases est impliqué dans la régulation de fission et fusion mitochondriales. La conservation de ces GTPases à travers les espèces a permis aux scientifiques de corréler les résultats issus des études d'avant-garde chez la levure avec les mécanismes potentiels de fission mitochondriale et la fusion dans les cellules des mammifères.

Le remodelage du réseau mitochondrial est fonctionnellement lié à la dynamique et au transport des organelles ; ces fonctions sont supportées par les protéines du cytosquelette (Hollenbeck PJ and Saxton WM, 2005) auxquelles les mitochondries sont attachées par l'action des Rho GTPases Miro 1 et Miro2 (Guo X *et al.*, 2005; Fransson S *et al.*, 2006).

VI.3.2.a La fusion mitochondriale

Les études chez la levure et la mouche drosophile ont identifié les protéines Fzo1 (membrane mitochondriale externe) et Mgm1 (membrane mitochondriale interne) comme médiateurs clé de la fusion mitochondriale (Hales KG and Fuller MT, 1997; Herman GJ and Shaw JM, 1998; Wong ED *et al.*, 2003).

Deux orthologues de Fzo1 existent chez les mammifères : la mitofusine 1 (MFN1) et la mitofusine 2 (MFN2) (Santel A and Fuller MT, 2001). Des mutations du gène orthologue de Mgm1 chez l'homme, *OPA1*, sont associées à l'apparition de l'Atrophie Optique de type 1, une maladie héréditaire, autosomique dominante, pour laquelle des altérations de la morphologie mitochondriale ont été décrites (Delettre G *et al.*, 2000). La protéine codée par ce gène a été en suite caractérisée pour avoir un rôle primaire dans la fusion mitochondriale (Cipolat S *et al.*, 2004).

Les protéines Fzo1, MFN1 et MFN2 possèdent des domaines hélicoïdaux hydrophobes qui permettent leur insertion dans les membranes. Ces protéines possèdent aussi des domaines « coiled-coil » ; la fusion des membranes externes a lieu lorsque ces derniers domaines s'alignent et interagissent en *trans* à la membrane externe de deux mitochondrie (pour revue Liesa M *et al.*, 2009). Il a été suggéré que les MFNs agissaient de manière similaire aux protéines du complexe SNARE qui promeuvent la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique. De façon analogue à SNARE, une isoforme mitochondriale de la Phospholipase D, PLD, la mitoPLD, et la production et l'élimination des lipides de signalisation (Cardiolipine, CL, Acide Phosphatidique, PA, DyacylGlicerole DAG et Isositole,4,5-biphosphate, IP4,5P₂) facilitent la fusion mitochondriale (pour une revue Huang H and Frohman MA, 2009) (Fig. 32).

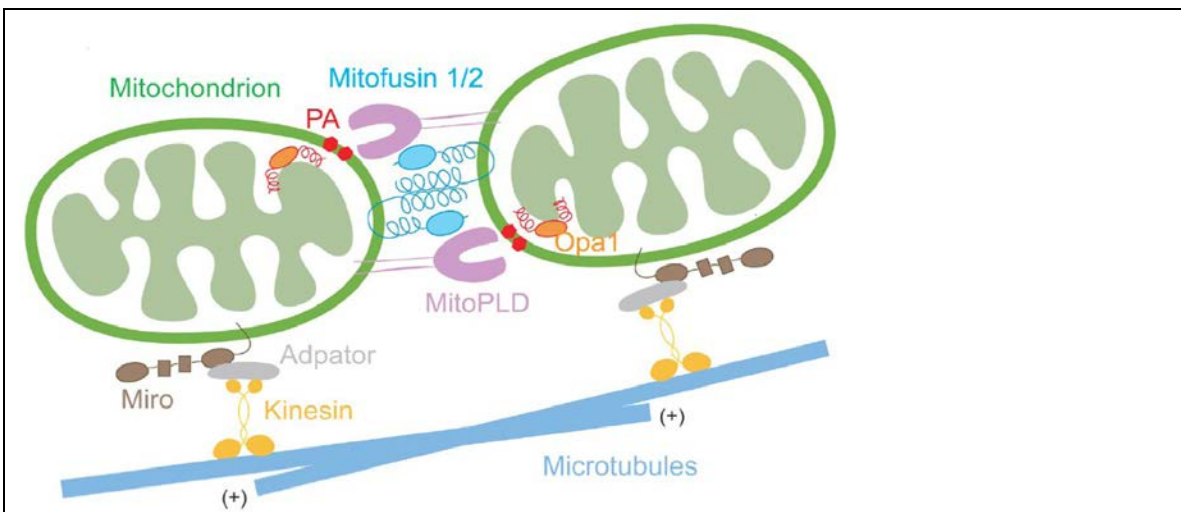


Figure 32 (d'après Huang H and Frohman MA, 2009) : modèle proposé pour la fusion et la dynamique mitochondriales. Au cours de la fusion, les protéines de la membrane mitochondriale externe, Mitofusin 1 et 2 réunissent deux mitochondries adjacentes, par leurs domaines « coiled-coil ». Pendant ces interactions les dimères de MitoPLD entrent en contact avec la cardiolipine sur la membrane mitochondriale opposée, générant l'acide phosphatidique, PA, qui à son tour facilite la fusion de la membrane externe. La fusion de la membrane interne est facilitée par la protéine Opa1. Les mitochondries sont transportées le long des microtubules en conséquence de l'interaction entre la protéine de la membrane externe, Miro, et la kinésine. Cette interaction est indirecte : la protéine adaptatrice Milton a un rôle de protéine adaptatrice (Glater EE *et al.*, 2006; Stowers RS *et al.*, 2002).

La protéine OPA1 chez les mammifères est codée par un seul gène avec huit variantes de transcription résultant d'un processus d'épissage alternatif (Delettre C *et al.*, 2001).

OPA1 et Mgm1 sont importées dans la mitochondrie grâce à une « séquence de ciblage mitochondrial » (MTS pour Mitochondrial Targeting Sequence) située à l'extrémité N-terminale de ces protéines. Les protéines sont accrochées à la membrane mitochondriale interne par un domaine hélicoïdal transmembranaire, adjacente à la MTS.

A la suite d'un processus de clivage protéolytique qui les libère de la membrane, Mgm1 et OPA1 se transforment en isoformes fonctionnellement actives. Les différentes variantes de OPA1 sont clivées différemment générant des isoformes longues et courtes dans les mitochondries. Les isoformes courtes de OPA1 sont plus lâchement fixées à la membrane mitochondriale interne, en comparaison des isoformes longues qui conservent un domaine hydrophobe (Ishihara N *et al.*, 2006).

Plusieurs protéases ont été identifiées qui pourraient être responsables du clivage de OPA1, y compris PARL (Cipolat S *et al.*, 2006), la i-AAA protéase YME1L (Griparic L *et al.*, 2007; Song Z *et al.*, 2007) et la protéase m-AAA (Duvezin-Caubet S *et al.*, 2007).

La présence dans la structure de la protéine des domaines GTPase, effecteur de la GTPase (GED) et de deux domaines « coiled-coil » permet la formation des structures complexes formées par plusieurs molécules de OPA1 afin d'opérer la fusion de la membrane mitochondriale interne. Une protéine putative, serait responsable de l'interaction entre OPA1 et MFN1, dont l'identité est encore inconnue (pour une revue Liesa M *et al.*, 2009).

Le clivage de OPA1 est accélérée lorsque le potentiel électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne est réduit, ce qui suggère que le clivage OPA1 et par conséquent son activité peuvent être réglés afin de coordonner l'état énergétique des mitochondries avec leur morphologie.

VI.3.2.b La fission mitochondriale

La fission mitochondriale produit des mitochondries sphériques ; la fission induit des changements ultrastructuraux importants et le remodelage des crêtes, y compris leur fragmentation, dilatation et vésiculation jusqu'à la disparition. Comme pour le

clivage de OPA1, ces changements s'associent à la diminution du $\Delta\Psi_m$ et de la production d'ATP (pour une revue Wasilewski M and Scorrano L, 2009).

La protéine GTPase Dynamin 1 (DNM1) chez la levure et son homologue mammifère « dynamin related protein 1 » (Drp1 ou Dynamin 1 Like Protein, DNM1L) sont responsables de la fission mitochondriale.

Drp1 interagit avec les lipides de la membrane mitochondriale externe par un domaine intermédiaire (VD, pour Variable Domaine), homologue du domaine plekstrine de la DNM1.

Au cours de la fission mitochondriale, après la fixation du GTP, les interactions en *cis* entre les domaines GTPase, et effecteur de la GTPase, GED (respectivement N-Terminal et C-Terminal), ainsi que les interactions en *trans* entre les domaines GEDs de plusieurs molécules, déterminent la formation de grandes structures spiraliformes aux sites de recrutement sur la membrane mitochondriale externe. A ce niveau le diamètre de la mitochondrie se réduit de $\sim 0,5 \mu\text{m}$ à $0,1 \mu\text{m}$. A son tour, l'hydrolyse du GTP provoque un changement soudain de conformation et le démontage de ces structures très ordonnées complétant l'événement de la fission (Frohlich C *et al.*, 2013; pour revu Liesa M *et al.*, 2009 et Otera H *et al.*, 2013) (Fig. 31).

La division mitochondriale se produit aux endroits où les tubules du RE s'enroulent autour des sites de la division mitochondriale (Friedmann JR *et al.*, 2011; Rowland AA and Voeltz GK, 2012).

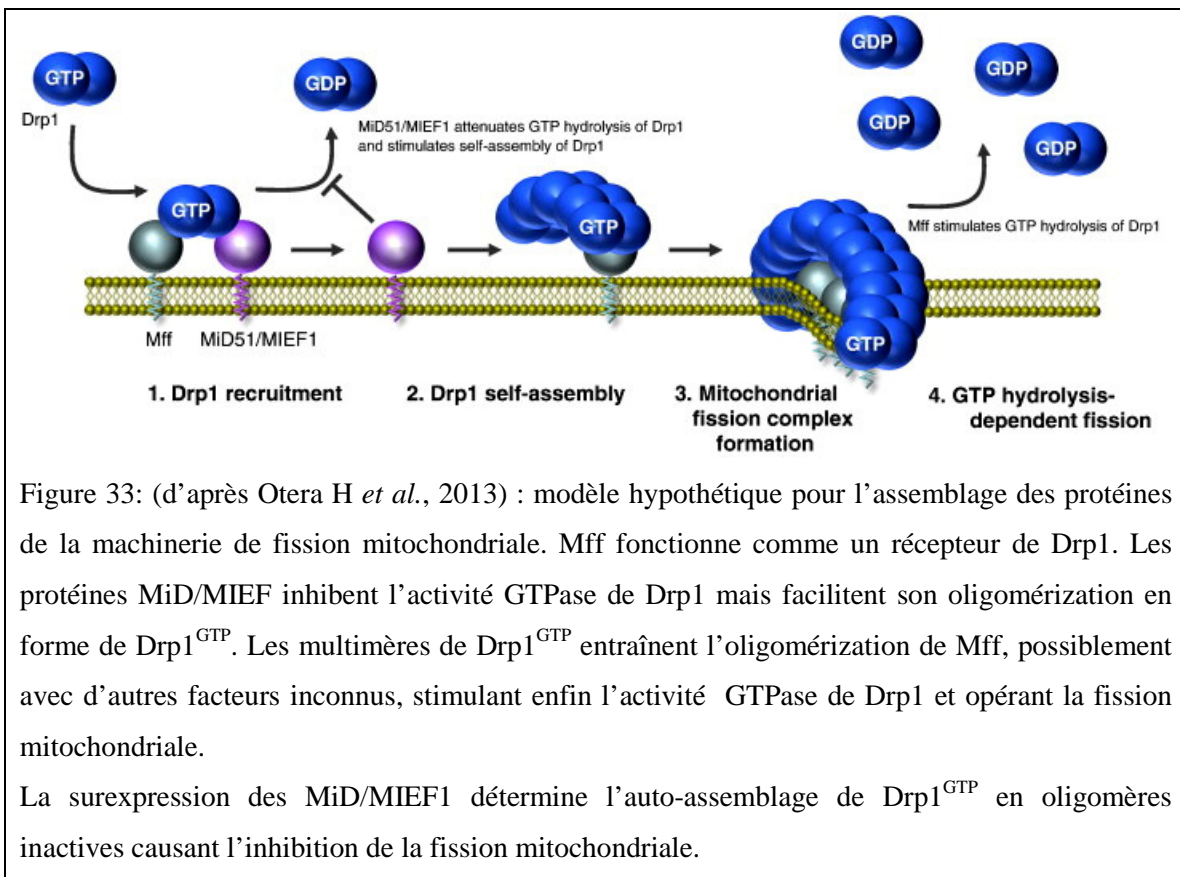
Recrutement de Drp1

Chez les mammifères la fission mitochondriale dépend du recrutement de Drp1 à la membrane mitochondriale externe. Pour ceci, l'interaction avec d'autres acteurs semble être nécessaire.

Chez la levure, FIS1, une petite molécule qui est localisée à la membrane mitochondriale externe, recrute la DNM1 cytosolique à la membrane mitochondriale par interaction indirecte. En effet dans le recrutement de DNM1, interviennent des adaptateurs similaires (Mdv1, Caf4) qui favorisent la nucléation et l'auto-assemblage de DNM1 en structures hélicoïdales, entraînant la fission de la membrane (revu dans Liesa M *et al.*, 2009; Otera H *et al.*, 2013) (Fig. 33).

Chez l'homme, le rôle de hFIS est moins clair, parce que la circulation de Drp1 entre les mitochondries et le cytoplasme ne nécessite pas de hFIS1 (Lee YJ, 2004; Wasiak S *et al.*, 2007). Toutefois l'inactivation de hFIS1 par SiARN inhibe la fission, ce qui suggère que hFis1 agit en aval du recrutement de Drp1 à la mitochondrie (Wasiak S *et al.*, 2007).

D'autres acteurs dans les processus de fission mitochondriale sont : la protéine MTP18, un effecteur de la voie de signalisation de la kinase 3 phosphatidylinositol (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) (Tondera D *et al.*, 2004), GDAP1 (Niemann A *et al.*, 2005) et des protéines adaptatrices, comme le facteur de fission mitochondriale (Mitochondrial fission factor, Mff) (Otera H *et al.*, 2010), le Facteur d'élongation mitochondriale 1/ protéines de la dynamique mitochondriale de 49 et 51 kDa (Mitochondrial Elongation Factor/Mitochondrial Dynamics proteins, MIEF1/MiD49/51) (Palmer CS *et al.*, 2011; Zhao J *et al.*, 2011), outre FIS1.



D'autres protéines candidates qui interagissent avec Drp1 pourraient effectivement jouer un rôle dans la régulation de ses fonctions sont l'Endophiline B1 (Karbowski M *et al.*,

2004), la Sacsine (Girard M *et al.*, 2012), la protéine LRRK2 (Wang X *et al.*, 2012; Niu J *et al.*, 2012) et la Huntingtine (Song W *et al.*, 2011; Costa V *et al.*, 2010).

La fonction de Drp1 dépend des besoins de la cellule et la simple modification des niveaux de la protéine Drp1 sauvage ne suffit pas à une augmentation de la fission mitochondriale. En revanche la régulation de l'activité de Drp1 peut avoir lieu au niveau de la translocation à la mitochondrie, de son assemblage en structures spirales, de son activité de GTPase ainsi que par des modifications post-traductionnelles de la même protéine ou des protéines qui interagissent avec elle (pour revue Otera H *et al.*, 2013).

VI.3.2.c Implication de la dysfonction de la fusion et fission mitochondriale au cours de la pathogénie de la MP et MH

Des anomalies de la morphologie mitochondriale ont été observées au cours des deux maladies.

La relation entre la machinerie de fission mitochondriale et les deux protéines impliquées dans les formes récessives de MP, Parkine et PINK1, est l'objet de mon projet de recherche dans l'équipe du Dr Corti. Les travaux scientifiques produits à propos des anomalies de fusion/fission dans les modèles MP sont considérés dans la partie Projet II de ce manuscrit.

En ce qui concerne la MH, plusieurs auteurs ont signalé des anomalies de la morphologie mitochondriale. La fragmentation mitochondriale a été observée *in vitro*, dans les neurones primaires après exposition à la toxine mitochondriale 3-NP (Liot G *et al.*, 2009), ou dans des cellules HeLa en présence de la HTT mutée (Wang H *et al.*, 2009). Dans ce modèle l'inhibition de la fission ou la promotion de la fusion mitochondriale rétablissent les fonctions bioénergétiques et la motilité mitochondriale altérées, selon les auteurs, en conséquence de l'interaction pathologique qui s'instaure entre la HTT et les MFNs en présence de l'expansion du domaine polyQ (Wang H *et al.*, 2009). En revanche, dans les publications plus récentes, l'augmentation de la fragmentation mitochondriale observée *post mortem* chez les patients MH, *in vitro* (fibroblastes, lymphoblastes des patients MH, neurones primaires et précurseurs striataux issus des

modèles rongeurs) et *in vivo* dans le striatum des souris MH, a été attribuée à l'interaction entre la HTT mutée et la protéine Drp1 et à l'augmentation de l'activité de ce dernier (Song W *et al.*, 2011; Costa V *et al.*, 2010; Shirendeb UP *et al.*, 2012).

L'excessive activation de Drp1 est censée augmenter la mort neuronale apoptotique au cours de la MH (Costa V *et al.*, 2010). En effet, cette observation pourrait s'expliquer considérant le lien étroit qui existe entre la fission mitochondriale, l'activation de l'apoptose et la mort cellulaire. La protéine pro-apoptotique BAX s'accumule aux sites de recrutement de Drp1 pendant l'apoptose (Karbowski M *et al.*, 2002) et l'interaction entre BAX et Drp1 est augmentée dans des conditions pro-apoptotiques (Leininger GM *et al.*, 2006).

VI.4. La voie de signalisation Nrf2/Keap1

Il est reconnu que cette voie de signalisation joue un rôle dans la régulation des fonctions mitochondriales

Le facteur Nrf2 « Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 », est un régulateur majeur de la réponse transcriptionnelle antioxydante, il est normalement séquestré dans le cytoplasme par la protéine Keap1 « Kelch-like ECH-associated protein 1 », un adaptateur pour le complexe ubiquitine ligase, de façon à être continuellement dégradé par la voie ubiquitine-protéasome (Itoh K *et al.*, 1999). En conditions de stress oxydant Nrf2 se détache de Keap1, il rentre dans le noyau, où il se lie aux Eléments de Réponse Antioxydante AREs (pour Antioxydant Response Elements), des gènes pour la réponse antioxydante, comme les gènes codant pour l'hème-oxygénase 1 (HO-1), la NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (Nqo1) et le facteur de respiration nucléaire 1, Nrf1 (pour Nuclear Respiratory Factor-1) (Dinkova-Kostova AT *et al.*, 2002; Piantadosi CA *et al.*, 2008; Venugopal R Jaiswal, AK, 1996).

La voie de signalisation Nrf2 intervient aussi dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (Piantadosi CA *et al.*, 2008) et a été impliquée dans les mécanismes de neurodégénérescence (Ramsey CP and Giasson BI, 2007; Mimoto T *et al.*, 2012).

VI.4.1 Implication de la voie Nrf2/Keap1 dans la MP et MH

En ce qui concerne la MP, la voie de signalisation Nrf2/Keap1 a été impliquée dans la médiation de la réponse anti-stress médiée par DJ1 (Clements CM *et al.*, 2006).

Très récemment il a été proposé que l'activation de la voie de signalisation Nrf2/Keap1 puisse jouer un rôle de lien entre les mécanismes de la fission mitochondriale et de l'activation de la UPR et la toxicité liée à la HTT mutée. La dysfonction de cette voie de signalisation a été décrite dans des cellules dérivées des précurseurs striataux, les cellules StHdhQ111/Q111 ; d'autre part dans ces cellules l'augmentation de l'expression de Nrf2 peut prévenir la fission mitochondriale dans ce modèle (Jin YN *et al.*, 2013).

L'effet protecteur de l'activation pharmacologique du facteur Nrf2 avait été déjà observé dans un modèle de MH induite par l'administration de l'acide 3- nitropropionique (3-NP), et dans les souris transgéniques N171-82Q, R6/2, et YAC128 (Calkins MJ *et al.*, 2010; Stack C *et al.*, 2010; Ellrichmann G *et al.*, 2011).

VI.5 La voie PINK1/Parkine et la mitophagie

L'observation que chez la drosophile l'inactivation des gènes *PARK2* et *PINK1* cause des graves altérations ultrastructurelles des mitochondries a constitué la base pour la découverte d'une voie fonctionnelle PINK1/Parkine.

Plusieurs observations faites sur les modèles de drosophile ont favorisé l'hypothèse de l'existence d'une voie fonctionnelle constituée par PINK1 et Parkine, impliquée dans le contrôle de la fonction mitochondriale: 1- l'inactivation des gènes codants pour Parkine et PINK1 détermine l'apparition d'anomalies mitochondriales similaires ; 2- l'inactivation contemporaine des deux gènes, *PARK2* et *PINK1*, ne provoque pas chez la mouche un phénotype plus grave que l'ablation d'un seul des deux ; 3- la surexpression de *PARK2* renverse les défauts observés en absence de PINK1 ; au contraire la surexpression de *PINK1* ne modifie pas le phénotype pathologique observé en absence de Parkine (Exner N *et al.*, 2007; Pesah Y *et al.*, 2004; Greene JC *et al.*, 2003 Clark IE *et al.*, 2006; Park J *et al.*, 2006; Yang Y *et al.*, 2006).

Dans cette voie PINK1/Parkine, la fonction de Parkine se positionne en aval de la fonction de PINK1.

Initialement, l'on avait attribué à cette voie le rôle de promouvoir la fission mitochondriale, vu que les anomalies mitochondriales observées dans ces modèles pouvaient être supprimées surexprimant le gène codant pour la protéine profission Drp1, ou invalidant la fonction des GTPases qui favorisent la fusion, Mitofusines (MFNs) et OPA1 (Deng H *et al.*, 2008; Poole AC *et al.*, 2008; Burman JL *et al.* 2012; Yang Y *et al.*, 2008). Successivement, les études effectuées sur les cellules de mammifères ont compliqué ce point de vue fournissant des preuves que cette voie peut régler la fusion et la fission mitochondriales, les résultats nets sur la connectivité mitochondriale dépendant du contexte cellulaire et des conditions expérimentales (revu dans la section Projet II).

En revanche, depuis des années, des preuves claires ont été fournies par plusieurs auteurs impliquant cette voie dans l'activation des mécanismes de contrôle de la qualité mitochondriale et la dégradation des mitochondries endommagées.

Plusieurs études ont montré le rôle primaire joué par PINK1 en ce qui concerne l'activation de la mitophagie.

La concentration mitochondriale de PINK1 est normalement maintenue basse par un mécanisme équilibré qui implique son importation à la mitochondrie et sa digestion par des protéases spécifiques, comme PMPC et PARL (Whitworth AJ *et al.*, 2008; Jin SM *et al.*, 2010; Deas E *et al.*, 2011). Les conditions comme la dépolarisation mitochondriale qui endommagent significativement les mitochondries favorisent l'activation de la mitophagie. Dans ces cas, la présence de PINK1 représente la *conditio sine qua non* (Geisler S *et al.*, 2010; Narendra D *et al.*, 2008; Narendra D *et al.*, 2010b; Matsuda N *et al.*, 2010; Vivez-Bauza C *et al.* 2010).

Les différentes phases de la mitophagie peuvent être résumées en : 1-stabilisation de PINK1 sur la membrane mitochondriale externe ; 2- recrutement de Parkine et conséquente rupture de la membrane externe ; 3- activation de l'autophagie de la membrane interne et de la matrice.

Ces étapes sont décrites dans les paragraphes suivants.

VI.5.1 Stabilisation de PINK1 sur la membrane mitochondriale externe

La stabilisation de PINK1 à la membrane mitochondriale implique la formation d'un complexe fonctionnel entre PINK1 et les protéines SARM1 et TRAF6 (Murata H *et al.*, 2013).

La protéine adaptatrice SARM1 appartient à la famille des récepteurs pour l'interleukine-1 Toll (Toll interleukin receptors, TIR). Cette protéine est particulièrement exprimée dans les neurones et a été impliquée dans la dégénérescence neuronale (Kim Y *et al.*, 2007; Osterloh J.M. *et al.*, 2012). Le facteur 6 associé au récepteur du TNF, TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) est une protéine E3 ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitylation de PINK1 sur le résidu de lysine 63 (K63). Cette ubiquitylation est facilitée par SARM1 et prévient la translocation dans la matrice, la digestion par la protéase PARL et par conséquent la dégradation de PINK1, le stabilisant sur la membrane mitochondriale externe. Egaleme nt, l'interaction directe entre Parkine et PINK1 représente un mécanisme additionnel qui augmente la stabilité de PINK1 et sa capacité de recruter Parkine (Shiba K *et al.*, 2009; Weihofen A *et al.*, 2008; Okatsu K *et al.*, 2012a).

VI.5.2 Recrutement de Parkine

Stabilisé sur la membrane mitochondriale externe, PINK1, dans sa forme phosphorylée, forme un complexe dimérique et se lie aux protéines du complexe TOMM (Translocator of the Outer Mitochondrial Membrane) (Lazarou M *et al.*, 2012; Okatsu K *et al.*, 2013) et recrute la Parkine, qui normalement est une protéine cytosolique, à la membrane mitochondriale externe. Ce recrutement dépend fonctionnellement de l'activité kinase de PINK1 : en effet PINK1 pourrait phosphoryler directement Parkine (Geisler S *et al.*, 2010; Narendra D *et al.*, 2008; Narendra D *et al.*, 2010b; Matsuda N *et al.*, 2010; Vivez-Bauza C *et al.* 2010; Lazarou M *et al.*, 2013; Shiba-Fukushima K *et al.*, 2012) vu que son domaine kinase est orienté sur le versant cytosolique de la membrane mitochondriale externe (Zhou C *et al.*, 2008). Le recrutement de Parkine, qui normalement est réprimée dans son activité de E3 ubiquitine-protéine ligase (Chaugule VK *et al.*, 2011), détermine

aussi son activation (Matsuda N *et al.*, 2010) et l'ubiquitylation (Lys48 et Lys63) des protéines mitochondriales (Geisler S *et al.*, 2010; Lee JY *et al.*, 2010; Matsuda N *et al.*, 2010; Chan NC and Chan DC, 2011).

In vitro il a été démontré que la protéine Nix, possédant comme Becline et Bcl2 un domaine BH3 et déjà connue pour promouvoir la maturation des cellules érythroïdes et l'autophagie dans de conditions d'hypoxie, contribue à l'efficacité de la mitophagie dans la phase de l'induction. De manière dépendante des EROs et de la dépolarisation mitochondriale, Nix pourrait à la fois stabiliser PINK1 à la membrane mitochondriale externe et contribuer à la translocation de Parkine (Ding WX *et al.*, 2010).

L'ubiquitylation et la dégradation Parkine-dépendante des protéines de la membrane externe, comme les protéines de la machinerie TOM (pour Translocator of the Outer Membrane (Chan NC *et al.*, 2011; Yoshii SR *et al.*, 2011; Bertolin G *et al.*, 2013), les mitofusines (Gegg ME *et al.* 2010; Poole AC *et al.* 2010; Ziviani E *et al.*, 2010; Glauser L *et al.*, 2011; Tanaka A *et al.* 2010; Rakovic A *et al.*, 2011), VDACs (Geisler S *et al.*, 2010) et Miro (Wang X *et al.*, 2011; Liu S *et al.*, 2012) ont une importance particulière. Celles-ci sont des protéines dont la fonction est liée, respectivement, à l'import, à la dynamique, à la bioénergie et au transport de la mitochondrie. Fonctionnellement la dégradation des protéines impliquées dans la fusion mitochondriale empêche la refusion des mitochondries endommagées qui, à la suite de la dégradation de Miro, sont aussi détachées du système de transport axonal. Enfin l'ubiquitylation Parkine-dépendante de l'isoforme 1 de l'Hexokinase (HK1) a lieu suite au recrutement de Parkine à la mitochondrie. HK1 (Okatsu K *et al.*, 2012b). L'Hexokinase, dont il existent différentes isoformes, catalyse la première étape obligatoire et ATP-dépendante du métabolisme du glucose, la phosphorylation du glucose à glucose-6-phosphate ; de plus, l'isoforme HK1, enrichie dans le cerveau, interagit avec VDAC à la membrane mitochondriale externe pendant la formation du PTP (Permeability Transition Pore). L'interaction entre Parkine et HK1 semble jouer un rôle dans le lien entre la fonction de la Parkine, la mitophagie et le métabolisme cellulaire.

L'actuation du programme qui porte à l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles comprend deux étapes distinctes : i) la rupture de la membrane mitochondriale externe et

ii) l'autophagie de la membrane interne et de la matrice. Même si les deux mécanismes dépendent de la présence de Parkine, ils se mettent en œuvre par 2 machineries distinctes. La rupture de la membrane externe est une étape dépendante du protéasome et non de la machinerie de l'autophagie et son inhibition compromet l'efficacité de l'autophagie des mitochondries endommagées (Chan NC *et al.*, 2011; Yoshii SR *et al.*, 2011).

VI.5.3 Activation de la mitophagie

La mitophagie dépendante de la voie PINK1/Parkine procède ensuite canoniquement par l'activation des protéines Atgs (Autophagy linked genes, gènes liés à l'autophagie) identifiées initialement chez la levure ; chez les mammifères plusieurs protéines homologues ont été caractérisées (Zhang J and Ney PA, 2010).

À la suite de l'ubiquitylation des protéines mitochondriales, la protéine adaptatrice p62/SQSTM1 est recrutée à la mitochondrie. La protéine p62/SQSTM1 à son tour induit la formation d'agrégats des mitochondries perinucléaires (Geisler S *et al.*, 2010; Narendra D *et al.*, 2010b; Okatsu K *et al.*, 2010) qui pourraient faciliter la mitophagie augmentant leur proximité au RE, une source de membranes autophagiques (Fig. 34).

La mitophagie dépendante de la voie PINK1/Parkine n'a pas été entièrement caractérisée par rapport à la voie autophagique canonique, toutefois la participation de LC3, p62 et Atg5 suggère qu'elle procède de façon similaire à la voie canonique.

La protéine AMBRA, une protéine à fonction Atg qui interagit avec Parkine, pourrait être médiatrice du lien entre le phagophore en formation et les protéines Beclin et Vps34 de la machinerie de l'autophagie (Van Humbeeck C *et al.*, 2011).

L'importance du rôle de la mitophagie dans la physiologie neuronale n'a pas été complètement éclairée, vu que la majorité des études concernant la mitophagie ont été faites sur des lignées cellulaires et que la dépolarisation massive obtenue par le CCCP ne représente pas un stimulus physiologique ni pour les cellules ni pour les neurones ; autres paradigmes expérimentales ont été découverts pour induire la mitophagie en conditions de dépolarisation moins dramatiques que celles obtenues par l'utilisation du CCCP, comme la déplétion de la protéase intramitochondriale PMPCB (Greene AW *et al.*, 2012). De plus, plus récemment il a été proposé que l'accumulation intramitochondriale d'agrégats protéiques et l'inactivation de la fonction d'une autre protéase mitochondriale,

la LON1, suffit pour activer la mitophagie et représente une condition indépendante de la dépolarisation (Jin SM and Youle RJ, 2013). Suite à ces observations une organisation hiérarchique entre les différents niveaux des systèmes de contrôle de qualité mitochondriale est soupçonnable : la mitophagie pourrait être la réponse activée au niveau de l'organite lorsque la capacité des chaperons et protéases mitochondriales, constituant l'UPR mitochondrial et responsables du repliement correct des protéines mitochondriales ou de leur dégradation, est dépassée.

En perspective, l'approfondissement du rôle de ces mécanismes dans la physiologie neuronale représente une priorité.

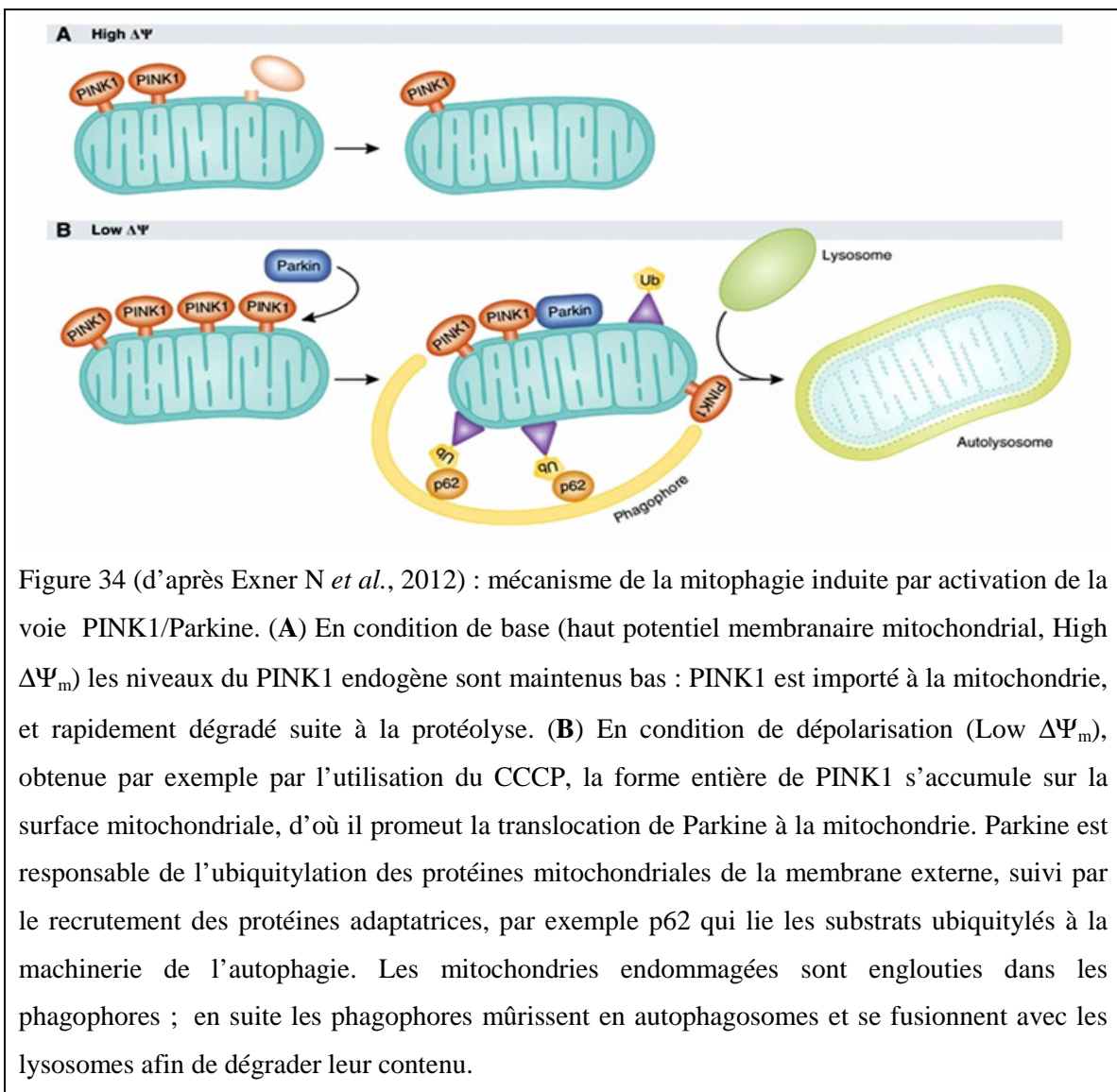


Figure 34 (d'après Exner N *et al.*, 2012) : mécanisme de la mitophagie induite par activation de la voie PINK1/Parkine. (A) En condition de base (haut potentiel membranaire mitochondrial, High $\Delta\Psi_m$) les niveaux du PINK1 endogène sont maintenus bas : PINK1 est importé à la mitochondrie, et rapidement dégradé suite à la protéolyse. (B) En condition de dépolarisation (Low $\Delta\Psi_m$), obtenue par exemple par l'utilisation du CCCP, la forme entière de PINK1 s'accumule sur la surface mitochondriale, d'où il promeut la translocation de Parkine à la mitochondrie. Parkine est responsable de l'ubiquitylation des protéines mitochondriales de la membrane externe, suivi par le recrutement des protéines adaptatrices, par exemple p62 qui lie les substrats ubiquitylés à la machinerie de l'autophagie. Les mitochondries endommagées sont englouties dans les phagophores ; en suite les phagophores mûrissent en autophagosomes et se fusionnent avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu.

VII. Projet I : Caractérisation de la fonction mitochondriale dans les modèles de rongeurs de MH

| | | |
|---|--|--------|
| VII.1 | Contexte : anomalies de la phosphorylation oxydative au cours de la MH | p. 178 |
| VII.2 | Objectifs | p. 181 |
| VII.3 | Méthodologie et développement du projet | p. 182 |
| VII.3.1 | Modélisation de la MH chez le rongeur | p. 182 |
| VII.3.1.a | Souris transgéniques utilisées | p. 185 |
| Modèle R6/1 | | p. 185 |
| Modèle N171-82Q | | p. 186 |
| Autres modèles | | p. 187 |
| VII.3.1.b | Modélisation de la MH par transfert de gènes chez le rongeur | p. 187 |
| VII.3.2 | Principales méthodologies utilisées | p. 191 |
| VII.3.2.a | Caractérisation du modèle R6/1 : <i>western blot</i> | p. 191 |
| VII.3.2.b | Caractérisation du modèle N171-82Q : | p. 191 |
| <u>Analyse de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale</u> | | p. 191 |
| Consommation d'oxygène | | p. 192 |
| Electrophorèse en gel natif pour l'isolement des complexes de la chaîne respiratoire (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, BN-PAGE). | | p. 194 |
| <u>Analyse de la fonction de la biogenèse mitochondriale</u> | | p. 201 |
| PCR quantitative en Temps Réel | | p. 201 |
| VII.3.2.c | Caractérisation du modèle de rat généré par transfert intrastriatal de transgènes codant les fragments N171- de la HTT sauvage (18Q) ou mutée (82Q) à l'aide de vecteurs lentiviraux | p. 205 |
| Production des vecteurs | | p. 206 |
| Injection Stéréotaxique | | p. 206 |
| Sacrifice des animaux et préparation des tissus | | p. 206 |
| VII.4 | Résultats | p. 208 |
| VII.5 | Discussion et perspectives | p. 214 |
| VII.6 | Données supplémentaires et remarques de conclusion | p. 218 |
| VII.6.1 | Remarques de conclusion | p. 221 |
| VII.7 | Article 1 | |

VII.1 Contexte : anomalies de la phosphorylation oxydative au cours de la MH

Des étapes communes et des résultats en partie cohérents émergent des études majeures réalisées sur les patients et sur les modèles transgéniques pour la MH. Ces études éclairent le rôle pathogénique des défauts bioénergétiques et les anomalies mitochondriales se produisant au cours de la MH ; ils peuvent être regardés en parallèle dans le tableau 6.

Tableau 6 : résumé des résultats majeures obtenus dans le cadre de la caractérisation des fonctions mitochondriales sur les patients atteints de MH et les modèles transgéniques (Pcr/Pi = Phospho-creatine/Phosphate ; HPLC =High Pressure Liquid Chromatography)

| Etudes sur les patients | Etudes sur les modèles cellulaires / animaux |
|---|---|
| Perte de poids (Clinique/Observation) | |
| Djousse L, 2002; Aziz NA, 2008 | Souris Mangiarini L, 1996; van der Burg, JM 2008 |
| Métabolisme énergétique déficitaire (IRM fonctionnelle ou HPLC) | |
| ↓ utilisation Glucose ; ↑Lactate et ↓ Pcr/Pi | ↑Pcr/ATP Zhang, SF, 2011 |
| Leenders KL, 1986; Jenkins BG, 1993; Koroshetz, WJ, 1997 ; Feigin A, 2001 | ↓ Pcr et ATP (HPLC, <i>post mortem</i>) Mochel F, 2012 |
| Défauts enzymatiques (respirometrie, spectrophotométrie, biochimie et hystoenzymatique) | |
| <ul style="list-style-type: none"> Cerveaux (HD II/III) Aconitase Tabrizi SJ, 1999 | Souris Krebs enzymes (Aconitase) Tabrizi, SJ 2000; Perluigi M, 2005; Zabel C, 2009 CoII Zabel C, 2009 |
| CoI-II-III-IV, Caudé-Putamen Guidetti P, 2001 | CoII-IV Aidt FH, 2013 CoIV Tabrizi, SJ 2000; Bae BI, 2005 |
| CoII-III, Caudé-Putamen Gu M, 1996; Browne SE, 1997 | Rats |
| <ul style="list-style-type: none"> Tissus périphériques CoI, muscles et plaquettes Parker WD, 1990; Arenas J, 1998 | CoII in vivo Brouillet E, 2008 CoII in vitro Benchoua A, 2006 and 2008 |
| | Levure |
| | CoII-III Solans A, 2006 |
| Lymphoblastes et Lignées Lymphoblastoïdes : | Lignées Cellulaires |
| Défaut ATP et $\Delta\Psi_m$ Sawa A 1999; Panov A 2005b | CoII Majumder P, 2007 Défaut respiration et ATP Milakovic T, 2005; Gines S, 2003 |

En effet, la perte de poids observée chez les patients atteints de MH en dépit d'un apport calorique normal, suggère la présence de défauts du métabolisme énergétique, confirmée par les études de spectroscopie et de PET *in vivo*, sur les patients ainsi que sur les modèles animaux (Tableau 6).

La diminution du nombre de mitochondries ainsi que de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale II, III et IV a été observée au cours des analyses *post mortem* des échantillons cérébraux (noyaux caudé et putamen) de patients atteints de MH à des stades avancés de la maladie. La réduction d'activité de l'aconitase a aussi été observée dans les études *post-mortem*.

Cependant l'analyse de l'expression et de l'activité des enzymes mitochondriaux dans les modèles animaux n'a pas donné pas de résultats cohérents. Les modèles de rongeurs exprimant la forme entière de la protéine HTT mutée (Guidetti P *et al.*, 2001) ne présentent pas les défauts enzymatiques de la chaîne respiratoire observés dans les échantillons humains, et retrouvés *in vivo* et *in vitro* dans les modèles rongeurs exprimant les fragments N-terminaux de la HTT mutée.

Des défauts bioénergétiques - diminution du $\Delta\Psi_m$ et du contenu en ATP - ont été mis en évidence dans les lignées cellulaires dérivées des progéniteurs striataux de souris *knock in* (KI) pour la protéine humaine mutée. Ces défauts ont été attribués à une dyshoméostasie calcique au niveau mitochondrial (pour revue Damiano M *et al.*, 2010).

La recherche d'anomalies spécifiques du Co II (Fig . 35) de la chaîne respiratoire précède ces observations, trouvant son origine historique dans la découverte que chez l'homme l'intoxication par le 3NP, un puissant inhibiteur du Co II, détermine l'apparition de dyskinésies corrélées pathologiquement à la nécrose du putamen (Ludolph AC *et al.*, 1991; He F *et al.*, 1995).

Dans différents modèles, rongeurs (Beal MF *et al.*, 1993; Brouillet E *et al.*, 1993) et primates non humains (Brouillet E *et al.*, 1995), des manifestations cliniques fort ressemblantes à celles observées chez les patients atteints de la MH apparaissent suite à l'administration de 3NP, devenue, depuis ces observations, une méthode largement utilisée pour modéliser la maladie.

Toutefois dans les différentes études l'hétérogénéité des méthodes utilisées et de l'âge des souris analysées représente une source d'erreur et rend difficile de conclure quant à la signification des défauts mitochondriaux dans la MH.

Le Complexe II, Co II, de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le Co II est composé de quatre sous-unités : deux sous-unités catalytiques, la sous-unité A, une flavoprotéine (SDHA ou Fp) et la sous-unité B, un ferro-protéine (SDHB ou Ip) ; les deux petites sous-unités complémentaires (SDHC et SDHD) servent à son ancrage à la membrane mitochondriale interne (Fig. 35).

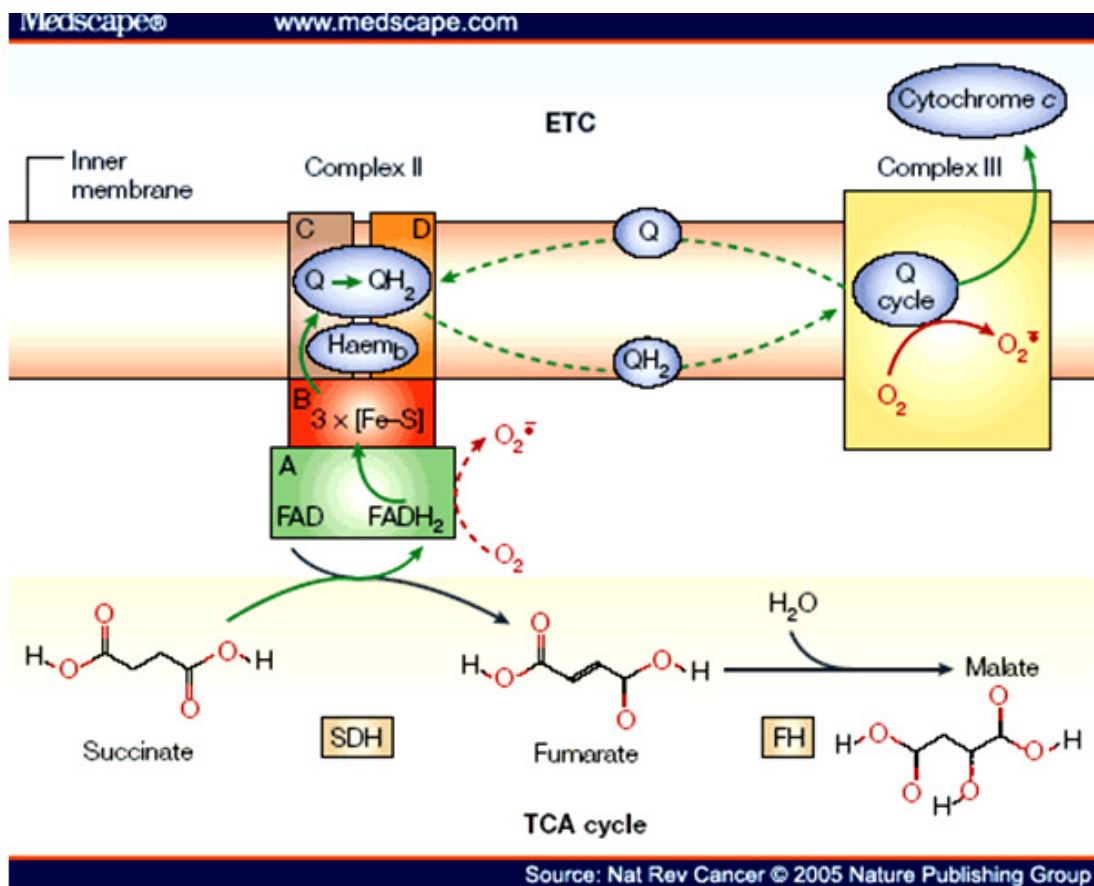


Figure 35 (d'après Gottlieb E, 2005) : le diagramme focalise l'attention sur le Co II ou Succinate Dehydrogenase (SDH) et l'enzyme Fumarate Hydratase (FH). Le flux des électrons entre les Complexes II et III de la chaîne respiratoire est représenté par les flèches vertes. Pendant l'oxydation du succinate à fumarate par la SDHA (Fp) la réduction, par deux électrons, du groupe prosthétique FAD - lié de manière covalente à l'enzyme - à FADH₂ a lieu. La sous-unité SDHB, Ip, une ferro-protéine, contient un domaine N-terminal similaire au domaine ferredoxine des

plantes, avec un motif Fe_2S_2 , et un domaine C-terminal similaire au domaine ferredoxine des bactéries, avec deux motifs Fe-S : Fe_4S_4 et Fe_3S_4 . Les électrons sont transférés à travers les centres Fe-S de la SDHB à l'ubiquinone (Q) lié aux sous-unités SDHC et SDHD dans la membrane mitochondriale interne, le réduisant à ubiquinol (QH₂). L'ubiquinone ou l'hème b – qui n'est pas considéré comme une partie intégrante de l'enzyme - se positionnent alternativement pour accepter les électrons qui proviennent des trois centres Fe-S, et pour échanger les électrons entre eux, avec des cinétiques compétitives. Les quinones sont des centres redox mobiles de la chaîne respiratoire (flèches à points). Le transfert des électrons de l'ubiquinol par le complexe III au cytochrome c prend le nom de Cycle Q. Puis le flux des électrons procède vers le complexe IV. Le Co III est un site bien caractérisé de production de $\text{O}_2^{\cdot-}$. La flèche rouge à traits indiqués la production de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans le site II_F du Co II suite à la réduction incomplète du FAD.

VII.2 Objectifs

Dans l'article 1 : **Damiano M, Diguët E et al. 2013 A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of human huntingtin. Human Molecular Genetics, Juin 2013** (inclus à la fin de cette section), nous avons exploré de manière cohérente la fonction mitochondriale dans des modèles génétiquement compatibles, tous exprimant un transgène codant des fragments N-terminaux de la HTT mutée, afin d'évaluer le potentiel du ciblage des fonctions mitochondriales dans une perspective thérapeutique. Les étapes de notre plan de travail sont résumées ci-dessous:

- A. Caractérisation de l'expression des sous-unités du Co II de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le striatum du modèle de souris R6/1.
- B. Caractérisation de la fonction mitochondriale dans les cerveaux des souris N171-82Q. Cette partie comprend l'étude de la phosphorylation oxydative et de la biogenèse mitochondriale.
- C. Caractérisation d'un modèle de rat dans lequel le transgène codant le fragment N171- de la HTT sauvage (18Q) ou mutée (82Q) est ciblé au striatum par injection stéréotaxique de vecteurs lentiviraux. Dans une première étape, les effets de la HTT mutée exogène ont été évalués sur la survie neuronale et sur l'expression striatale des sous-unités Fp et Ip du Co II. Dans une deuxième étape

nous avons évalué l'effet neuroprotecteur de la surproduction de ces sous-unités vis-à-vis de la toxicité la HTT mutée.

Les résultats inclus dans l'article s'intègrent dans un projet plus vaste ; à la fin de cette section je montre les résultats d'expériences complémentaires non publiées qui contribuent à la compréhension du rôle des différents types de dysfonctions mitochondriales au cours de la pathogénie de la MH.

VII.3 Méthodologie et développement du projet

VII.3.1 Modélisation de la MH dans les rongeurs, généralités

Plusieurs modèles de rongeurs transgéniques pour la MH existent. La caractérisation de chaque modèle a élargi nos connaissances des mécanismes pathogéniques de la MH. Une classification des modèles rongeurs disponibles pour la MH comprend : les souris transgéniques, les rats transgéniques et les modèles, rats et souris, obtenus par la stratégie virale de transfert de gènes.

Parmi les modèles des souris et des rats transgéniques, on peut distinguer ceux exprimant des fragments N-terminaux comprenant l'exon 1 de la HTT et ceux exprimant la HTT mutée entière. Les premiers doivent leur origine à l'observation que les agrégats présents dans les tissus cérébraux de patients atteints de MH contiennent des fragments de la protéine HTT mutée. Ces fragments dérivent du clivage de la protéine par les caspases et d'autres enzymes protéolytiques, comme décrit dans la section IV - mécanismes pathogéniques de la MH.

Les symptômes typiques de la maladie, comme les troubles moteurs, les anomalies comportementales, la perte du poids sont visibles dans les deux types de modèles (pour revue Pouladi MA *et al.*, 2013). Des différences toutefois existent entre les modèles exprimant les fragments N-terminaux et ceux exprimant la HTT mutée entière, par exemple, en ce qui concerne la sévérité du phénotype, plus grave et précoce dans les souris exprimant les fragments N-terminaux, ou la durée de vie, qui peut être normale dans les souris exprimant la forme entière de la HTT mutée mais est toujours raccourcie dans ceux exprimant les fragments N-terminaux. Une autre différence concerne les troubles comportementaux et psychiatriques qui tendent à être plus évidentes dans les

souris exprimant la HTT mutée entière. Les altérations neuropathologiques typiquement neurodégénératives, comme la formation d'agrégats la perte neuronale et l'atrophie du cerveau, sont aussi observées dans les deux types de souris ; celles-ci sont aussi plus précoces, étant marquée par l'apparition d'agrégats déjà à la naissance, et plus généralisée, pouvant s'étendre au cervelet, dans les souris exprimant les fragments N-terminaux, lorsqu'elle est tardive et liée au vieillissement et limitée aux régions striatales et corticales dans les souris exprimant la HTT mutée entière. Conformément au confinement de la pathologie au striatum chez l'homme, chez la souris la forme entière de la HTT mutée s'accumule et est clivée préférentiellement dans le striatum des animaux transgéniques (Li H *et al.*, 2000). L'étude des modèles exprimant la forme entière s'est révélée très utile pour la compréhension des phénomènes liés à la spécificité tissulaire (pour revue Pouladi MA *et al.*, 2013).

Les modèles des rongeurs transgéniques existant sont résumés dans les tableaux suivants (d'après Pouladi M *et al.*, 2013 et références y contenues)

Tableau 7 : Modèles transgéniques exprimant des fragments N-terminaux de la HTT mutée.

| Modèles MH Fragments N-terminaux | Transgène | Promoteur | Répétitions CAG |
|---|--|---|----------------------------|
| R6/1 | 67 acides aminés (aa) de la portion N-terminale de la HTT humaine | 1Kb promoteur HTT humaine | 117 |
| R6/2 | | | 144 |
| N171-82Q | 171 aa de la portion N-terminale de la HTT humaine | Protéine Prion murin | 82 |
| HD 94 | 67 acides aminés aa du fragment N-terminal d'une protéine chimérique (exon 1 HTT humaine : HTT murine) | CamKII | 94 |
| Souris Shortstop | 171 aa du fragment N-terminal de la HTT humaine | Promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 128 |
| N118-82Q | 118 aa de l'ADNc de la HTT humaine | Protéine Prion murin | 82 |
| N586-82Q | 586 aa de l'ADNc de la HTT humaine | Protéine Prion murin | 82 |
| Ubi-G-HTT 84Q | 67 aa de l'ADNc de la HTT humaine fusionnés à l'EGFP | Promoteur de l'ubiquitine | 84 |
| HD 150 QG | 67 aa de l'ADNc de la HTT humaine fusionnés à l'EGFP | 1Kb promoteur HTT humaine | 150 |
| HD 190 QG | | | 190 |
| Rats HD 51 | Fragment N-terminal (22 % de la protéine) de la HTT de rat | promoteur HTT de rat | 51 |

Tableau 8 : Modèles knock in (KI) exprimant la HTT mutée entière.

| Modèles MH KI pour la HTT entière | Transgène | Promoteur | Répétitions CAG |
|--|--|-------------------------------|----------------------------|
| CAG 140 | Protéine HTT humaine chimérique (HTT exon 1 humain : HTT murine) | promoteur HTT murine endogène | 119 140 |
| Hdh Q 92 | Protéine HTT humaine chimérique (HTT exon 1 humain : HTT murine) | promoteur HTT murine endogène | 92 |
| Hdh Q 111 | Protéine HTT humaine chimérique (HTT exon 1 humain : HTT murine) | promoteur HTT murine endogène | 111 |
| Hdh Q 150 Hdh Q 200 | Protéine HTT humaine chimérique (HTT exon 1 humain : HTT murine) | promoteur HTT murine endogène | 150 200 |
| Hdh4/ Q 72 Hdh4/ Q 90 | Protéine HTT humaine chimérique (HTT exon 1 humain : HTT murine) | promoteur HTT murine endogène | 72 90 |
| zQ175 | Protéine HTT humaine chimérique (HTT exon 1 humain : HTT murine) | promoteur HTT murine endogène | 188 |

Tableau 9 : Modèles transgéniques exprimant la HTT mutée entière.

| Modèles Transgéniques HTT mutée entière | Transgène | Promoteur | Répétitions CAG |
|--|---|---|----------------------------|
| HD 48 HD89 | HTT humaine entière | promoteur CMV | 48 89 |
| YAC 128 | HTT humaine entière | promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 128 |
| YAC 48 | HTT humaine entière | promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 48 |
| YAC 48 | HTT humaine entière | promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 77 |
| BACHD | HTT humaine entière | promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 97 |
| Hu 97/18 | HTT humaine entière | promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 97 |
| iFL148Q | ADNc HTT humaine entière (tétracycline inducible) | Protéine Prion murine | 148 |
| Rats BACHD | HTT humaine entière | promoteur HTT humaine et éléments régulateurs | 97 |

VII.3.1.a Souris transgéniques utilisées

Les souris transgéniques les R6 (R6/1, R6/2 et R6/5 (Mangiarini L *et al.*, 1996; Davies SW *et al.*, 1997) et les N171-82Q (Schilling G *et al.*, 1999), caractérisées dans notre étude sont largement le plus utilisées dans le domaine. Dans ces modèles le fragment N-terminal comprenant l'exon 1 de la HTT est exprimé respectivement sous le contrôle du promoteur de la HTT humaine et de la protéine Prion (PrP) murine.

Modèle R6/1

Les souris de la lignée R6 sont transgéniques pour un fragment de 1,9 kb du gène humain. Ce fragment - qui provient du clivage entre les sites de restriction *Sac*-*EcoRI* de la séquence du cDNA (ADN complémentaire) dérivé d'un patient atteint de MH - est composé de la séquence 5' UTR, de l'exon 1 contenant l'expansion du triplet CAG et des 262 premières paires de bases de l'intron 1. L'expansion comprend 115 CAG pour les souris R6/1 ; dans ces souris une seule copie est intégrée dans le génome murin, après microinjection (Mangiarini L *et al.*, 1996) (Fig. 36).

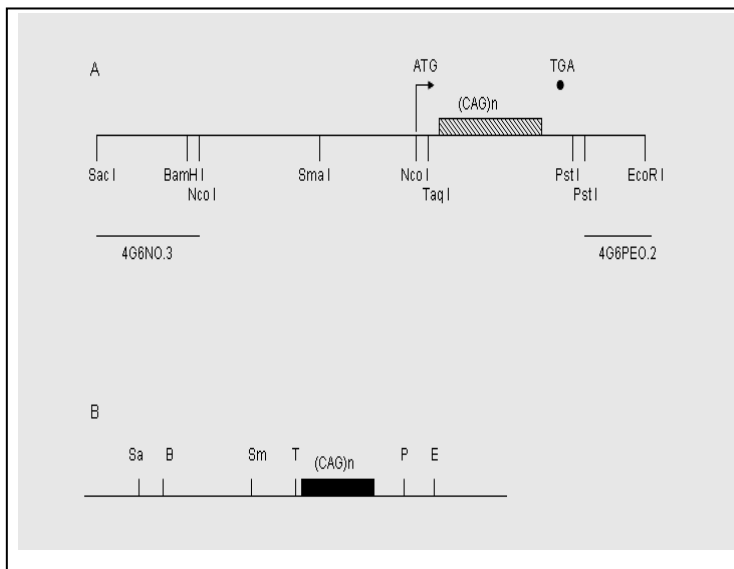


Figure 36 (modifiée d'après Mangiarini L *et al.*, 1996) : fragment de micro-injection et identification des sites d'intégration du transgène pour le modèle R6. A) Carte des sites de restriction du fragment de génome humain utilisé pour la micro-injection. La flèche indique le site d'initiation de la transcription et la boule noire indique la position d'un codon stop dans le cadre de lecture au début de l'intron 1.

4G6SN0.3 et 4G6PE0.2 sont des fragments utilisés comme sondes d'hybridation. B) Organisation génomique des sites d'intégration du transgène. Sa=Sac I ; B=BamH I ; Sm=Sma I ; T=Taq I ; P=Pst I ; E=EcoR I.

Dans les souris du modèle R6/1 le transgène est exprimé de façon ubiquitaire. Les souris transgéniques présentent un phénotype neurologique progressif qui rappelle,

cliniquement et pathologiquement, la MH, y compris les mouvements choréiques, les mouvements stéréotypés involontaires, les tremblements et les convulsions épileptiques (Mangiarini L *et al.*, 1996; Davies SW *et al.*, 1997).

Modèle N171-18Q ou - 82Q

Le fragment N-terminal, représenté par les premiers 171 acides aminés du cDNA du gène *IT15* - contenant un nombre normal (N171-18Q) ou pathologique (N171-82Q) de triplets CAG - flanqué par une séquence 'linker' *SalI*, a été inséré dans les sites de clivage *XhoI* du promoteur de la protéine Prion (PrP) murine (Schilling G *et al.*, 1999) (Fig. 37). L'utilisation de ce promoteur permet l'expression de la protéine dans tous les neurones du système nerveux central (Borchelt DR *et al.*, 1996). La caractérisation de ce modèle a fourni une autre démonstration que l'expression du fragment N-terminal de la HTT mutée suffit chez la souris à déterminer l'apparition d'un phénotype comportemental et pathologique qui récapitule les traits de la MH chez l'homme, y compris la présence d'inclusions intra-nucléaires et neuritiques (Schilling G *et al.*, 1999).

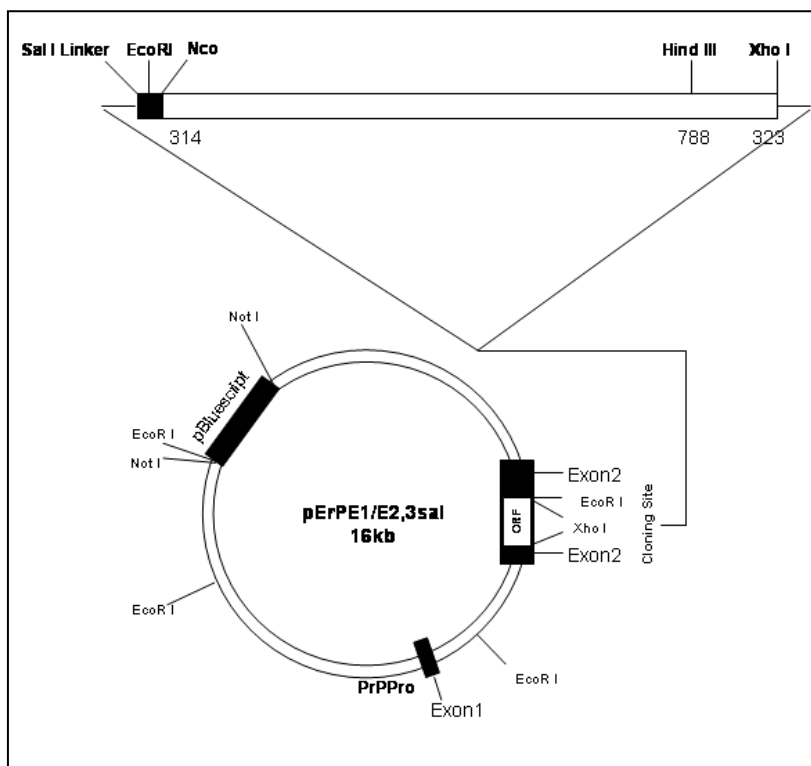


Figure 37 (d'après Schilling G *et al.*, 1999) : le fragment HD - N171 avec un trait polyQ normal (18Q) ou pathologique (82Q) inséré dans un plasmide codant pour le promoteur de la protéine prion murine.

Les souris N171-82Q existent en plusieurs lignées présentant un âge de début variable. La durée de vie est immanquablement raccourcie : les différentes lignées générées présentent une survie variable, de 2,5 jusqu'à 11 mois d'âge. La lignée que nous avons étudié présentait une survie d'environ 5 mois, correspondant à celle observée pour les lignées 81 et 100 de la description faite dans la publication originelle (Schilling G *et al.*, 1999). Les souris présentent plusieurs troubles : la perte de poids, le tremblement, des anomalies de la marche, le manque de coordination, la diminution des réponses aux stimuli extérieurs ; dans les phases finales elles présentent des mouvements anormaux (suspendues par la queue, elles croisent souvent leurs pattes) et une diminution du 'grooming' (Schilling G *et al.*, 1999).

Autres modèles utilisés

Dans des expériences complémentaires j'ai utilisé les souris NLS-N171-82Q (Schilling G *et al.*, 2004) dans lesquelles le transgène N171-82Q a été ciblé au noyau par l'ajout d'une séquence de localisation nucléaire (NLS, pour Nuclear Leading Sequence) dérivée du gène codant l'atrophine 1.

J'ai aussi utilisé les souris transgéniques BACHD (pour Bacterial Artificial Chromosome) et des cellules dérivées des souris KI-Hdh Q111 ; ces deux modèles expriment la HTT mutée entière sous le promoteur du gène de la HTT (Wheeler VC *et al.*, 2000; Lin CH *et al.*, 2001; Menalled LB *et al.*, 2002; Gray M *et al.*, 2008; Abada YS *et al.*, 2013).

La description de mes expériences complémentaires et les données concernant la fonction mitochondriale dans ces modèles sont comprises dans le paragraphe **VII.5 Données supplémentaires**.

VII.3.1.b Modélisation de la MH dans les rongeurs par transfert de gènes

Des fragments, de tailles différentes, du gène codant pour la HTT sauvage ou mutée ont été insérés dans des vecteurs adénoviraux, AAV (Senut MC *et al.*, 2000; DiFiglia M *et al.*, 2007; Franich NR *et al.*, 2008) ou lentiviraux (De Almeida LP *et al.*, 2002) et surexprimés, après injection stéréotaxique, de façon ciblée dans le striatum de rats (Senut

MC *et al.*, 2000; De Almeida LP *et al.*, 2002; Franich NR *et al.*, 2008) ou de souris (DiFiglia M *et al.*, 2007).

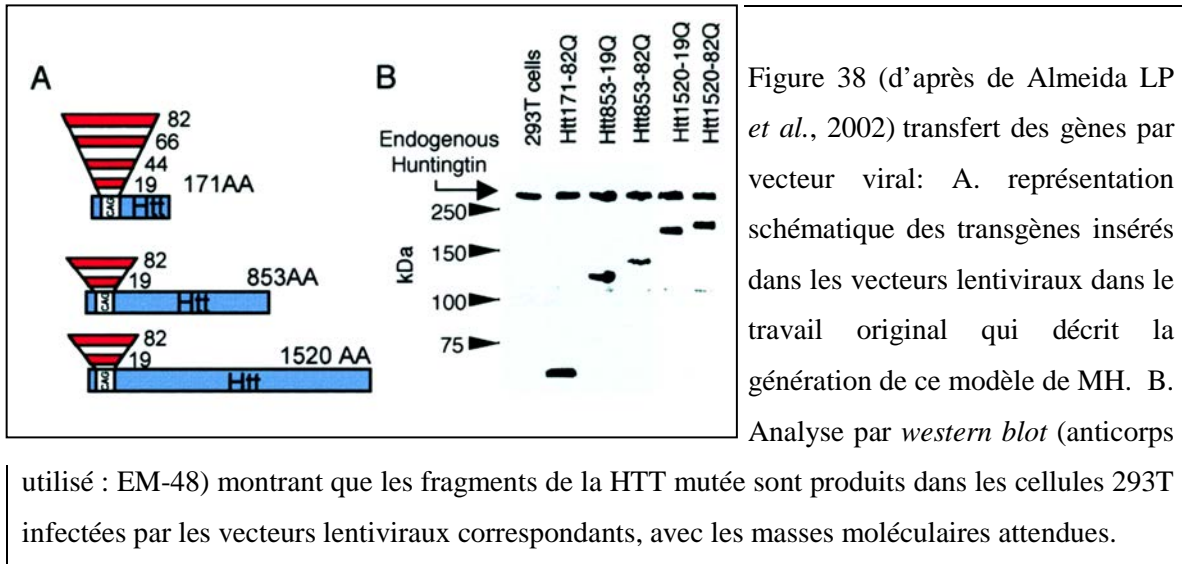
Les vecteurs viraux existent en plusieurs types, qui diffèrent par la taille de l'insert, le pouvoir infectieux, le tropisme et le pouvoir de diffusion. Les vecteurs viraux utilisés ont subi des modifications génétiques les empêchant de se répliquer (Self inactivating, SIN) (Tableau 10).

| Famille | Caractéristiques | Localisation | Taille de Clonage | Réponse Immunitaire | Dispersion |
|--|---|-----------------------------|-------------------|---------------------|------------|
| Lentivirus Famille Rétrovirus | Virus à ARN Simple Brin + Enveloppe | Intégration aléatoire | 9 kb | Faible | Faible |
| Adénovirus Famille Adénovirus | Virus à ADN Double Brin - Enveloppe | Pas d'intégration (épisode) | 28 kb | Forte | Forte |
| AAV (Adéno Associated Virus) Famille Parvovirus | Virus à ADN Simple Brin - Enveloppe | Intégration sur un site | 4.7 kb | Faible | Forte |

Tableau 10 (d'après la "Génétique moléculaire Humaine" de Pasternak JJ, 2003) : principaux virus utilisés dans le transfert de gènes dans la MH. Tous les virus énumérés ont une égale capacité d'infecter les cellules mitotiques ou post-mitotiques.

Pour ce travail nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux (LV) SIN. C'est en 2002 que le transfert de gènes avec des vecteurs lentiviraux exprimant la HTT mutée a été mis au point (de Almeida LP *et al.*, 2002). Des fragments codant des fragments de la HTT mutée de différentes tailles (171, 853, 1520 acides aminés), associées à un nombre croissant de répétition de glutamine (19, 44, 66, 82 Q), ont été insérés dans ce type de vecteur (Fig. 38). Deux promoteurs ont été utilisés pour contrôler le niveau d'expression du transgène, à savoir le promoteur de la Phosphoglycérate kinase 1 (PGK 1) de souris et celui du Cytomégalo virus (CMV). Ces vecteurs ont été injectés dans le striatum de rat. Le suivi de l'infection a été fait sur 24 semaines. La sévérité du phénotype et le début des symptômes

sont liés à la taille du fragment de la HTT exprimée et à celle de l'expansion du domaine polyQ.



Les vecteurs LV SIN (Fig. 39) ont une délétion dans la région U3 3' LTR (pour Long Terminal Repeat) qui contient le promoteur viral. Cette délétion possède un double avantage : 1) elle élimine les éléments transcriptionnels viraux qui risquent d'interférer avec le promoteur du transgène, et avec les gènes voisins au site d'intégration ; 2) elle limite les risques de recombinaison avec un virus sauvage.

Les rétrovirus, y compris les lentivirus, possèdent trois classes de gènes : 1) le gène *gag*, codant pour les protéines de structure (matrice, capsid, nucléocapsid) ; 2) le gène *pol*, codant pour les enzymes viraux tels que la rétro-transcriptase et l'intégrase ; 3) le gène *env*, codant pour la glycoprotéine de l'enveloppe.

Leur génome contient aussi des séquences *cis*-régulatrices situées dans le LTR, nécessaires à l'encapsidation (séquence Ψ) et, après infection de la cellule cible, à l'intégration dans le génome de l'hôte, à leur rétrotranscription, et à l'expression des trois classes de gènes (*gag*, *pol*, *env*).

Le tropisme des lentivirus est déterminé par la glycoprotéine de l'enveloppe, qui se lie aux récepteurs de la cellule cible. Il est possible de modifier le gène « *env* » par le gène d'enveloppe d'un autre virus : on parle de pseudotypage. Pour ce travail, les vecteurs lentiviraux ont été pseudotypés avec la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire

(VSV-G), qui confère aux vecteurs un fort tropisme neuronal dans le SNC (pour une revue Kafri T, 2004).

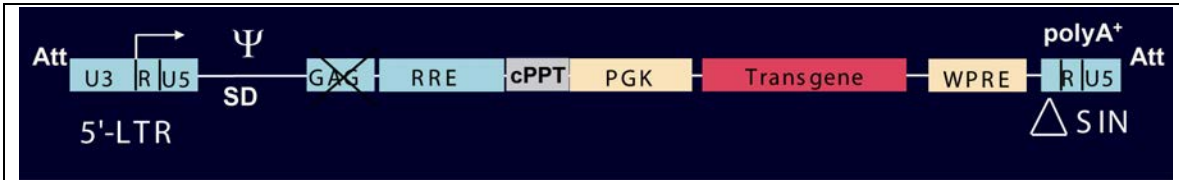


Figure 39: séquence d'un vecteur lentiviral inactivé utilisé dans notre étude.

Le site « Att » permet l'intégration du virus dans le génome de l'hôte. La séquence « ψ » est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN viral. La séquence RRE (Rev Responsive Element) favorise le transport dans le cytoplasme de l'ARN. Un domaine riche en purine (cPPT, pour central polyurine tract) est ajouté pour augmenter la transduction du transgène. Le promoteur PGK et le transgène d'intérêt sont insérés après le domaine cPPT. La séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus) est un élément de régulation post-transcriptionnelle qui favorise l'expression du transgène. Pour des raisons de sécurité, la séquence *gag* est déléetée ainsi qu'une partie de la séquence 3'LTR (SIN, self inactivating) contenant le promoteur viral, pour empêcher sa réplication dans l'hôte.

VII.3.2 Principales méthodologies utilisées

VII.3.2.a Caractérisation du modèle R6/1 : *western blot*

Les données concernant l'expression des sous-unités du Co II de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les souris R6/1 ont été obtenues par la méthode de *western blot*. Des extraits protéiques obtenus à partir d'échantillons de tissu striatal des souris transgéniques et contrôles ont été analysés. Ces données ont été générées dans le laboratoire du Prof Jordi Alberch, du département de biologie cellulaire de l'université de Barcelone.

VII.3.2.b Caractérisation du modèle N171-82Q

La caractérisation de la fonction mitochondriale dans le modèle N171-82Q consiste en plusieurs étapes conçues pour définir la présence d'un défaut de la fonction mitochondriale par respirométrie. Nous avons aussi exploré la relation entre le défaut observé par respirométrie et a) l'organisation moléculaire de la chaîne respiratoire, explorée par la méthode BN-PAGE, ou b) la biogenèse mitochondriale, une autre fonction mitochondriale contrôlée, comme l'expression et l'assemblage du Co II, par le génome nucléaire.

Analyse de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale

Il est possible de mesurer la consommation d'oxygène, un des paramètres de la fonctionnalité de la chaîne respiratoire mitochondriale, à partir de tissus frais, de cellules en cultures ou de mitochondries purifiées. Par exemple, partant d'un cerveau murin excisé il est possible obtenir des préparations enrichies de mitochondries purifiées, fonctionnelles (couplées) et suffisamment concentrées en mettant en jeu un gradient de Percoll (Damiano M *et al.*, 2006). Dans un délai de quelques heures (2-3h) les mesures de respirométrie peuvent être combinées aux mesures fluorimétriques, pour évaluer la capacité mitochondriale de rétention calcique et le potentiel de membrane mitochondriale, $\Delta\Psi_m$; dans les premières heures après l'isolement, il est aussi possible d'effectuer la mesure de la production d'ATP mitochondriale par luminométrie (Manfredi G *et al.*, 2002). S'agissant du paramètre le plus sensible, les mesures de la consommation d'oxygène sont réalisées aussitôt après l'isolement des mitochondries ou la trypsinisation des cellules en culture.

Ces préparations peuvent être utilisées, dans un deuxième temps, pour d'autres applications, comme l'isolément des complexes en leur conformation native (BN-PAGE).

Consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est mesurée dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (37°C), fermée et agitée, munie d'une électrode de Clark mesurant en continu la concentration d'oxygène dans le milieu. L'électrode de Clark traditionnelle, en argent et platine (Hansatech), est immergée dans une solution saturée de KCl. L'électrode est isolée de la cuve de mesure par une membrane de téflon qui laisse diffondre l'oxygène. Dans ces conditions, les variations de courant électrique, induites par la réduction de l'oxygène au niveau de l'électrode sont directement proportionnelles aux variations de la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation contenu dans la cuve de mesure. Les mesures oxygraphiques sont réalisées dans un volume final de 0.3-0.5 ml de tampon de respiration contenant : KCl (125 mM), HEPES (20 mM), MgCl₂ (1mM), KH₂PO₄ (2mM) et EGTA (20 µM) ; de l'albumine de sérum bovin (ASB), délipidée (0.1%) peut aussi être présent ; le pH doit être ajusté à 7,4. A 37°C, la concentration en oxygène dans ce tampon est d'environ 220 nmol d'oxygène par mL. A ce tampon de respiration sont ajoutés les mitochondries (0,25 mg/ml pour les mitochondries du cerveau) et des substrats respiratoires en concentrations saturantes.

Différents substrats peuvent être utilisés afin d'analyser la contribution des différents complexes de la chaîne respiratoire à la consommation d'oxygène. Ainsi les substrats qui fournissent NADH et FADH₂ permettent d'évaluer respectivement la contribution relative des complexes I et II. En même temps, la contribution spécifique de chaque complexe est évaluée en présence, dans le milieu de respiration, d'inhibiteurs sélectifs des complexes en amont (i.e. on utilise des substrats spécifiques du Co II en présence d'un inhibiteur du Co I). Les substrats les plus couramment utilisés sont :

- glutamate / malate (5 mM / 1 mM), substrat fournisseur de NADH ;
- pyruvate (1mM), substrat fournisseur de NADH ;
- le succinate (2 mM), substrat fournisseur de FADH₂ est utilisé en association avec la roténone (1 µg/ml), inhibiteur du Co I ;
- glutamate / malate (5 mM / 1 mM) + du succinate (2 mM).

Il est aussi possible d'évaluer l'activité du Co IV par oxygraphie en utilisant le N,N,N',N' TétraMéthyl-1,4-PhenylèneDiamine (TMPD, 1 mM) en présence d'ascorbate (1,5 mM) et d'antimycine A (1 µg/µl) un inhibiteur du Co III. L'ascorbate cède ses électrons au TMPD, qui à son tour réduit le cytochrome c, substrat du Co IV.

D'autres substrats comme la proline, la palmitoylcarnitine, l'octanoylcarnitine peuvent être utilisés ; la proline est un substrat protéique fournisseur de NADH et de FADH₂ ; la palmitoylcarnitine et l'octanoylcarnitine sont des substrats lipidiques qui permettent d'avoir un index de la β-Oxydation.

Différentes phases peuvent être mesurées pendant un essai de respirométrie. L'ajout au milieu de respiration, contenant les substrats de la chaîne respiratoire, d'une quantité déterminée de la préparation (cellulaire ou mitochondriale), donne lieu à une respiration basale, l'état 2, qui génère et maintient le $\Delta\Psi_m$. L'addition d'ADP (de 200 à 400 µM pour le cerveau) détermine le passage à la phase phosphorylante, accélérée de la respiration, l'état 3. Pendant cette phase l'utilisation de la force protomotrice par le complexe V est maximisée afin de générer l'ATP. La respiration 'au repos', ou état 4, est obtenue après l'ajout d'oligomycine (1 µg/mL), l'inhibiteur spécifique de l'ATP synthétase, ou de carboxyatractyloside, cATR (50 µM), l'inhibiteur de la l'adénosine nucléotide translocase. Un exemple d'un essai de respirométrie est montré dans la figure 40. Un paramètre important est le contrôle respiratoire, RCR (pour Respiratory Control Ratio), correspondant au rapport entre la respiration à l'état 3 et la respiration à l'état 4 ; ce rapport reflète le degré de couplage entre l'oxydation et la phosphorylation.

D'autres paramètres peuvent aussi être mesurés ; par exemple, les agents découplant, trifluorocarbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP), carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) ou 2,4-DiNitroPhénol (DNP) sont utilisés pour mesurer la consommation maximale d'oxygène. Ces agents découplent l'oxydation des substrats de la phosphorylation de l'ATP permettant la fuite des électrons au niveau de la membrane mitochondriale interne et empêchant la formation du gradient des protons. Leur concentration dépend du tissu et/ou du type cellulaire dont proviennent les mitochondries.

Enfin, l'ajout de KCN (1mM) (au lieu du cATR) bloque la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV et permet donc de mesurer la consommation non respiratoire de l'oxygène.

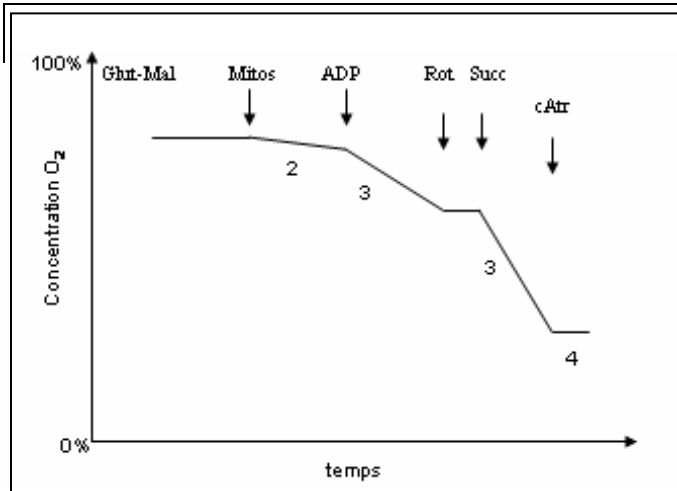


Figure 40 : exemple d'une courbe de respiration. Les états 2, basale, 3, phosphorylante, et 4, de repos, de la respiration sont indiqués. Ils diffèrent en ce qui concerne la vitesse de la consommation d'oxygène qui se reflète dans le degré de la pente.

La présence de substrats Glutamate-Malate (Glut-Mal) 5 mM/1 mM et de

Succinate (Succ) 2 mM, permet d'évaluer la fonction des Complexes I et II respectivement. L'ajout de la roténone (Rot), permet d'étudier la contribution exclusive du Co II à la respiration.

L'oxymétrie par électrode de Clark, représente une technique classique et fiable pour l'analyse des fonctions mitochondriales. Cependant des nouvelles technologies à haute résolution ont été développées, comme le système Oroboros et le système d'analyse des flux extracellulaires XF (XF Extracellular Flux Analyzer). Par ces systèmes il est possible de mesurer la consommation d'oxygène à partir des homogénats des tissus ou à partir de quantités très limitées des tissus ou cellules.

Electrophorèse en gel natif pour l'isolement des complexes de la chaîne respiratoire (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, BN-PAGE).

La méthode de l'électrophorèse en gel natif représente un moyen puissant pour explorer l'organisation moléculaire et supramoléculaire de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La première description de la méthode BN-PAGE a été donnée par Schagger et Von Jagow en 1991 (Schagger H and Von Jagow G, 1991).

Par cette technique il a été découvert que l'ATP-synthétase F1-F0 (Co V) existe en forme dimérique (Arnold I *et al.*, 1998) et que l'organisation de la chaîne respiratoire consiste en un réseau de super-complexes (Schagger H and Pfeiffer K, 2000).

Les différents complexes de la chaîne respiratoire, chacun étant constitué de plusieurs sous-unités protéiques, sont hébergés à la membrane mitochondriale interne. Le principe de la méthode BN-PAGE consiste en l'utilisation de détergents à faible pouvoir, afin de permettre la solubilisation des membranes biologiques et le détachement des complexes multiprotéiques de la membrane, tout en préservant les interactions protéine-protéine qui existent entre les sous-unités de chaque complexe. Les détergents sont des molécules amphipathiques composés d'une tête polaire, ionique ou non-ionique, et d'une queue hydrocarbonique ; ils dissolvent la couche de lipides constituant la membrane et solubilisent les lipides et les protéines intramembranaires dans des micelles stables, avec un cœur aqueux. Typiquement, deux détergents non ioniques, le n-dodecyl- β -D-maltoside et la digitonine, sont utilisés pour la méthode BN-PAGE. Contrairement aux détergents ioniques (anioniques, cationiques, et zwitterioniques), ces détergents ne modifient pas la structure des protéines.

La centrifugation des échantillons suit la solubilisation et permet la séparation des membranes non solubilisées des complexes protéiques solubilisés dans les micelles de détergents.

Les différentes étapes de la méthode BN-PAGE sont :

- préparation des échantillons
- préparation du gel BN-PAGE et migration en première dimension
- transfert électrique
- immunodétection des complexes avec les anticorps

Préparation des échantillons

Cette étape comprend la solubilisation des complexes, la centrifugation des échantillons et l'ajoute du colorant anionique Comassie blue G-250.

Mes expériences regardent l'isolement des complexes en partant des préparations de mitochondries isolées des cerveaux murins par le gradient de Percoll (Damiano M *et al.*, 2006, Article 4).

Après l'isolement, le tampon pour la solubilisation des complexes contient : acide Aminocaproïque (1,5 mM) et BisTris base (50 mM) ; le pH est ajusté à 7,0 à 4°C. Dans un tube eppendorf la préparation mitochondriale (50 µg) est suspendue dans ce tampon (volume final, 50 µl). La quantité idéale de détergent nécessaire à la complète solubilisation de chaque complexe peut varier en fonction des cellules et des tissus utilisés, qui diffèrent en contenu en lipides et protéines. Une phase de mise au point est donc nécessaire afin d'établir cette quantité : une concentration trop basse de détergent ne suffirait pas à isoler les complexes ; d'autre part en utilisant des quantités excessives de détergent l'on risquerait de dissocier les complexes multiprotéiques en leurs sous-unités composantes. Pour la mise au point de la technique, des quantités croissantes d'une solution à 10% (dans l'eau) de n-dodecyl-β-D-maltoside sont ajoutées à la suspension mitochondriale (Fig. 42). La préparation est incubée 5' à 4°C (sur la glace). Le tube est centrifugé à 20.000g pour 30' et le surnageant, contenant les complexes solubilisés, est transféré dans un tube propre.

Après la solubilisation, le colorant anionique Comassie blue G-250 est ajouté à la préparation. Le Comassie blue G-250 est solubilisé à une concentration de 5% dans une solution tampon contenant : acide Aminocaproïque (750 mM), BisTris (50 mM), EDTA (0,5 mM) ; le pH est ajusté à 7,0 à 4°C. 5 µl de cette solution sont ajoutés au surnageant de la préparation mitochondriale, issu de l'étape précédente.

Le colorant se lie à la surface de toutes les protéines intramembranaires ainsi qu'à un certain nombre de protéines solubles. En ajoutant des charges négatives à la surface des protéines différents effets sont observés : 1) le point isoélectrique des protéines se modifie devenant plus négatif ; 2) les charges négatives additionnelles sur la surface des protéines individuelles les repoussent les unes les autres. Le résultat est que la tendance à l'agrégation des protéines de membrane est fortement réduite. 3) Les protéines associées au colorant et chargées négativement sont solubles dans une solution qui ne contient plus de détergent. Le détergent peut donc être omis pendant la préparation du gel de gradient, minimisant ainsi le risque d'une dénaturation. 4) Les complexes associés au colorant,

pendant l'électrophorèse, deviennent visibles en tant que bandes bleues. Ceci facilite l'excision des bandes pour des applications ultérieures (deuxième dimension ou électroélution).

La composition en sous-unités de chaque complexe sera déterminée en faisant migrer le matériel des bandes excisées d'un gel BN-PAGE sur un gel SDS-PAGE (deuxième dimension).

Préparation des gels BN-PAGE et migration en première dimension

Les tampons suivants sont préparés à l'avance

| Solutions | Compositions |
|---------------------------------------|---|
| Tampon Gel (3X) pH 7.0 à 4°C | 150 mM BisTris 1.5mM Acide Aminocaproïque |
| Mix acrylamide-bisacrylamide (Mix AB) | 48g de acrylamide et 1,5 g de bisacrylamide dans 100 ml de H ₂ O |
| Tampon Cathode (Bleu) | 250 mM Tricine; 75 mM BisTris; (0.02% Comassie Blue G-250) |
| Tampon Anode | 250 mM Bis Tris |

Tableau 11 : Composition des solutions nécessaires à la préparation et à la migration électrophoretique d'un gel BN.

Dans notre protocole expérimental nous avons utilisé un gel de gradient 5-13%. Ceci permet la séparation des complexes de taille comprise entre 130 et 900 kDa. Le gel est surmonté par une partie dite de « stacking » à 4%.

Le gel est préparé suivant les indications ci-dessous (Tableau 12).

| | Gel « stacking » (X2) | | Gel de séparation – Gradient (X1) | |
|------------------|-----------------------|---------|-----------------------------------|---------|
| | 4% | 5% | 5% | 13% |
| AB Mix | 0.8 ml | 0.51 ml | | 1.31 ml |
| Tampon Gel (3x) | 3.34 ml | 1.67 ml | | 1.67 ml |
| Glycérol | — | — | | 1 ml |
| H ₂ O | 5.79 ml | 2.79 ml | | 1 ml |
| 10% APS | 110 µl | 3 µl | | 1.5 µl |
| TEMED | 11 µl | 30 µl | | 15 µl |
| Volume total | 10.05 | 5 ml | | 5 ml |

Tableau 12 : Schéma pour la préparation d'un gel de gradient 5-13%, pour le BN-PAGE.

L'organisation de l'appareil pour la préparation des gels de gradient est indiquée dans la Figure 41.

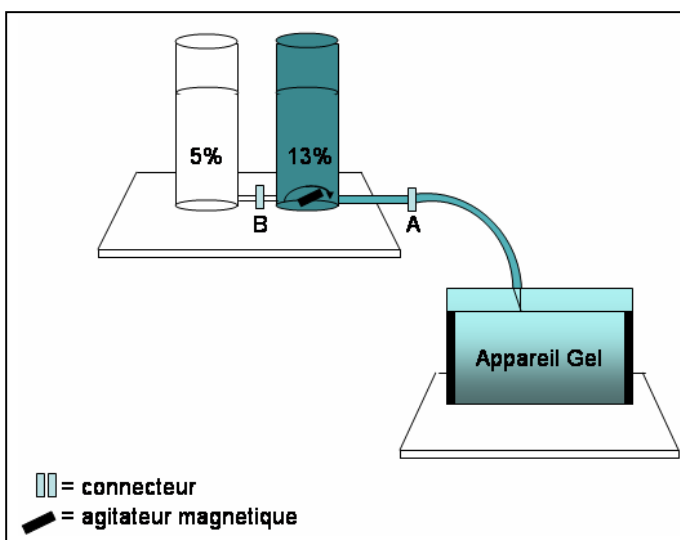


Figure 41 : pour la préparation des gels de gradient, deux chambres cylindriques connectées sont remplies de solutions d'acrylamide, comme indiqué. La chambre contenant la solution à 13% est dotée d'un agitateur magnétique pour assurer le mélange homogène des deux solutions après l'ouverture, en séquence, des connecteurs B et A. La pression

hydrodynamique détermine la formation d'un gradient linéaire des solutions à 5% et 13% pendant le transfert à l'Appareil Gel, situé au dessous du plan où sont placés les cylindres.

Les complexes protéiques sont séparés sur le gel à la suite de la migration électrophorétique, sous l'action d'un champ électrique (80mV à 4°C).

La solution Tampon Cathode, placée dans la chambre supérieure de la cuve électrophorétique, est enrichie par l'ajout du colorant Comassie Blue G-250 (0.02%) pendant la première partie de la migration. Lorsque la ligne bleue correspondant au front de migration dépasse la moitié de la hauteur du gel, le Tampon Cathode bleu est substitué par une solution Tampon Cathode sans colorant. La migration est considérée complète lorsque la ligne bleue correspondant au front de migration atteint la base du gel et le colorant bleu commence à se répandre dans la solution Tampon Anode, placée à la base de la cuve d'électrophorèse.

Le transfert électrique

Les complexes protéiques séparés sur les gels sont ensuite transférés sur une membrane en fluorure de polyvinylidène, PVDF, selon les protocoles standard pour le transfert liquide. Le Tampon de Transfert (10X) contient : TRIS-Base (200mM), Glycine (1.5 M), SDS (0.5%). Le transfert est effectué à 4°C, pendant la nuit. Un agitateur magnétique assure le maintien d'une température homogène dans la cuve.

Immuno-détection des complexes et révélation par électrochimiluminescence

A la fin du transfert la membrane est incubée dans une solution de lait (5%). Plusieurs heures de lavage dans cette solution (remplacée à des intervalles réguliers) sont nécessaires pour éliminer le bleu en excès et saturer les sites de liaison non spécifique des anticorps sur la membrane. Les anticorps primaires monoclonaux (utilisés comme indiqué dans l'article) sont aussi dilués dans une solution de lait à 5% et laissés interagir avec la membrane pendant une heure à température ambiante, ou plusieurs heures en chambre froide. Après rinçage de la membrane afin d'enlever les anticorps primaires non liés, celle-ci est exposée à l'anticorps secondaire, dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. J'ai utilisé des anticorps secondaires liés à la peroxydase de raifort qui, à la suite de l'incubation avec un réactif luminescent contenu dans les kits de révélation commercialement disponibles, émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéines des complexes détectés (Fig. 42).

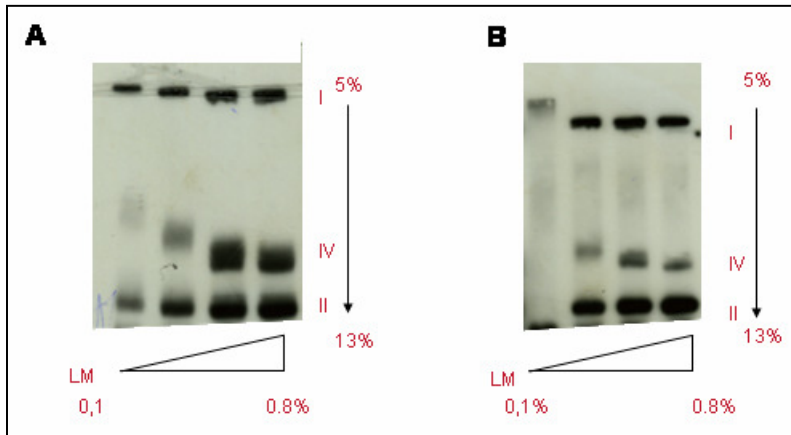


Figure 42 : exemple de mise au point de la méthode BN-PAGE pour l'isolement des complexes (I, IV et II indiqués à droite de chaque panneau) de la chaîne respiratoire mitochondriale. A) Complexes de la chaîne respiratoire isolés à partir de

mitochondries purifiées utilisant un gradient de Percoll ; B) complexes de la chaîne respiratoire isolés à partir d'une fraction mitochondriale enrichie, mais non purifiée, d'une préparation de cortex cérébral d'une souris de contrôle. Des concentrations croissantes de n-dodecyl- β -D-maltoside (Lauryl Maltoside, LM) ont été ajoutées à la suspension mitochondriale concentrée (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dans le tampon de solubilisation, jusqu'à obtenir la quantité maximale de chaque complexe. Ceci est démontré, après immunoblot, par l'augmentation progressive de l'intensité des bandes correspondant à chaque complexe. Noter que le LM à la concentration la plus élevée (0.8%) la dégradation de certains complexes (A, complexe IV ; B complexes I et IV) est observée, ce qui indique que les conditions optimales pour la séparation des complexes en conditions natives sont dépassées. Poids moléculaires : Co I 880 kDa ; Co V 600 kDa ; Co III (dimère) 460 kDa ; Co IV 200 kDa ; Co II 130 kDa .

Analyse de la fonction de la biogenèse mitochondriale

PCR quantitative en temps réel

Cette méthode est utilisée afin de quantifier dans une préparation contenant l'ADN total la quantité relative correspondant au nombre de copies d'un gène ; elle est aussi utilisée pour l'analyse de la quantité des transcrits, à partir d'une préparation d'ARN.

Dans les deux cas les étapes fondamentales sont l'extraction des acides nucléiques et la PCR quantitative en temps réel ; pour l'analyse des transcrits une étape additionnelle de synthèse des ADN complémentaires (cDNAs) est nécessaire avant l'exécution de la PCR.

Extraction des acides nucléiques et Rétro-Transcription des ARNs

L'extraction de l'ADN total a été réalisée à partir des cellules ou tissus, avec des méthodes standard, basées sur l'utilisation de phénol - phénol/chloroforme pour l'ADN. Pour l'extraction de l'ARN total, après élimination de l'ADN par la DNAase décontaminée de RNAase, une méthode standard basée sur l'utilisation de TriZol a été utilisée. La lecture spectrophotométrique de l'absorbance de ces échantillons à 260 nm et à 280 nm permet en même temps le calcul de la concentration de l'ADN ou de l'ARN, et de juger de la qualité des produits d'extraction. L'ADN extrait est donc prêt pour l'utilisation dans la PCR. Pour l'analyse de la quantité des transcrits les cDNAs sont synthétisés à partir de l'ARN par rétrotranscription. A cette fin, la préparation d'ARN total est incubée à 65°C pour 5' à une concentration déterminée, dans une solution contenant : de l'eau dépourvue de ribonucléases, les amorces, le mix de nucléotides (dNTPs), du MgCl₂ (la concentration doit être optimisée entre 1,5 et 0,8 mM), l'enzyme transcriptase inverse et un inhibiteur ribonucléase.

En ce qui concerne les amorces, il existe plusieurs options : on peut utiliser des Oligo(dT)₁₅, des amorces 'random', ou des amorces spécifiques pour un gène cible.

Les amorces Oligo(dT)₁₅ sont appariées à l'extrémité 3' de toute molécule d'ARN polyadenilé. Le choix des amorces 'random' est idéal pour la synthèse de cDNAs à partir des ARNs totaux, incluant les ARNs qui ne contiennent pas de queue de poly(A).

Au cours de notre étude nous avons choisi des amorces 'random', vu que le rôle de la polyadénylation des ARN mitochondriaux chez les eucaryotes supérieurs est encore débattu (Chang JH and Tong L, 2011).

La concentration des amorces doit toujours être optimisée. Généralement on conseille l'utilisation de 0,5 µg de Oligo(dT)₁₅ ou d'amorces 'random', et une concentration finale entre 0,5 et 1 mM pour les amorces spécifiques.

PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative pour l'ADN a été réalisée en utilisant le kit « Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green » (Roche) à l'aide du système « Light Cycler Carousel-Based System » (Roche), qui nécessite l'utilisation des capillaires.

La présence du colorant SYBR Green dans le réactif SYBR Green rend possible la détection des produits de PCR en temps réel (Real Time) pendant l'exécution de la réaction.

Préparation du Mix (1 capillaire)

| | Volume (Vol) µl |
|-------------------------|-------------------------|
| H ₂ O | Jusqu'à 8 µl, Vol Final |
| MgCl ₂ 25 mM | Variable (2,5 et 5 mM) |
| Amorce sens | 1 µl (conseillé 0,5 µg) |
| Amorce anti-sens | 1 µl (conseillé 0,5 µg) |
| SYBR Green reconstitué | 2 µl |

Tableau 13 : composition du Mix pour un essai de RT-PCR

Outre le SYBR® Green I Dye, le réactif SYBR® Green contient la AmpliTaq Gold® DNA Polymérase, les dNTPs avec le dUTP, une référence passive, et des tampons. La référence passive, un colorant fluorescent qui n'interfère pas avec la réaction, fournit une valeur de fluorescence sur la base de laquelle la fluorescence du réactif SYBR® Green I Dye est normalisée pendant l'exécution de la réaction.

Une courbe standard est préparée, correspondant à une concentration d'ADN entre de 0 et 10 ng. Les échantillons en général ont besoin d'être dilués, normalement entre 1/10 et 1/50. Dans le capillaire, 8 µl du Mix contenant le SYBR Green sont ajoutés aux 2 µl de l'échantillon (dilué). Après la dénaturation initiale (10 minutes à 95° C) environ 40

cycles de PCR sont effectuées, qui comprennent les trois phases classiques de la PCR : 1) dénaturation à 95° C pour 10 secondes ; 2) appariement à une température variable selon la séquence des amorces (calculée sur la formule $2^{\circ}\text{C} (\text{A}+\text{T})+ 4^{\circ}\text{C} (\text{G}+\text{C})$), de durée variable de 0 à 10 secondes ; 3) élongation, normalement à 72° C pour une durée variable selon la taille du produit d'amplification, généralement calculée selon la formule : taille en paires de bases (bp)/25secondes.

Un cycle pour la courbe de dénaturation suit les cycles d'amplification et est utile afin d'évaluer la spécificité des produits de la réaction d'amplification ; ceci comprend aussi trois phases : 1) dénaturation à 95° C ; 2) appariement à 65° C ; 3) dénaturation, normalement à 95° C. Le pic obtenu pendant la courbe de dénaturation correspond à la fluorescence générée par la dénaturation des produits de PCR. La présence de plusieurs pics indique la non spécificité des amorces et la génération de plusieurs produit d'amplification.

Les résultats sont normalisés en utilisant les gènes de référence. La taille des produits peut être vérifiée sur gel d'agarose à 2% contenant de l'éthidium bromide, qui intercale l'ADN et le rend visible aux rayons UV.

Le logiciel d'un système RT-PCR calcule les valeurs correspondant à la ligne de base et au seuil détecteur sur la base du principe qu'une courbe d'amplification donnée a une allure typique, comprenant (Fig. 43):

- une phase plateau (a)
- une phase linéaire (b)
- une phase exponentielle (phase géométrique) (c)
- un bruit de fond ou 'background'(d)
- la ligne de base (e)

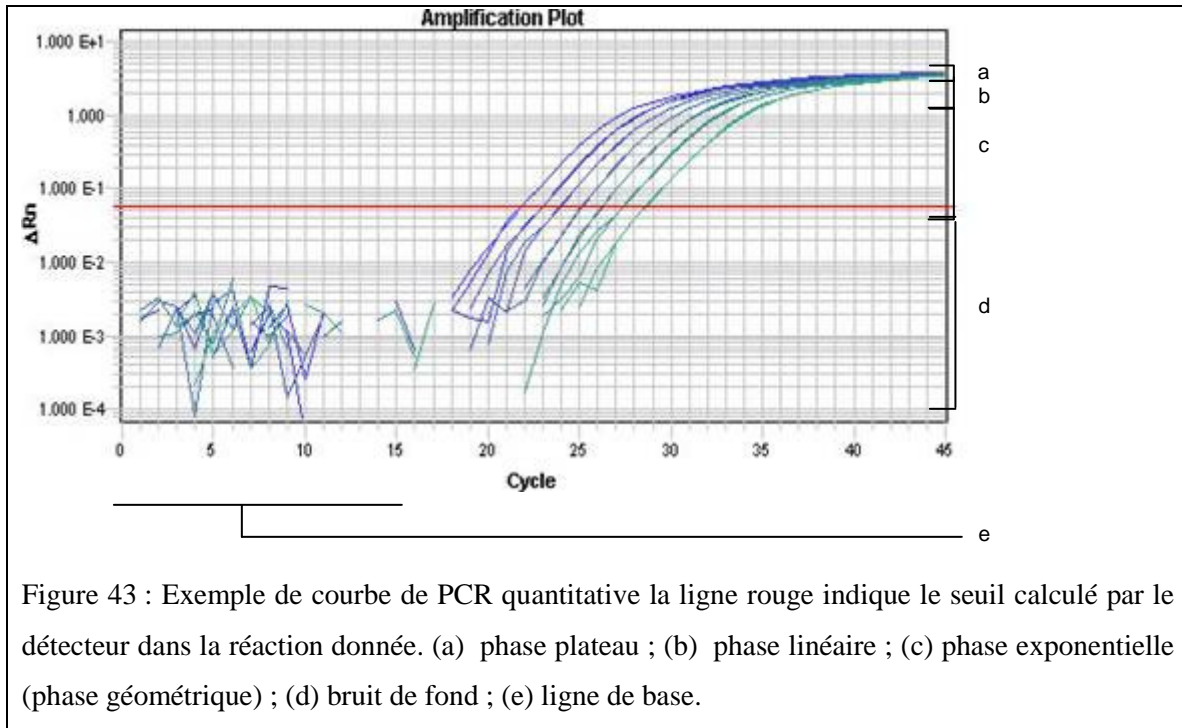


Figure 43 : Exemple de courbe de PCR quantitative la ligne rouge indique le seuil calculé par le détecteur dans la réaction donnée. (a) phase plateau ; (b) phase linéaire ; (c) phase exponentielle (phase géométrique) ; (d) bruit de fond ; (e) ligne de base.

La PCR quantitative pour l'ARN a été réalisée utilisant le kit « Light Cycler RNA Master SYBR Green » (Roche) à l'aide du système de détection « Light Cycler Carousel-Based System » (Roche).

En alternative, le système SYBR Green de Applied Biosystems (Foster City, CA) et le système de détection «ABI prism 7300 HT» (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ont été utilisés.

La quantité de l'ADN mitochondrial (mtDNA) correspondant au fragment du gène codant la sous-unité I (codée par le génome mitochondriale) de l'enzyme mitochondriale Cytochrome c Oxidase COX, (du nucléotide (nt) 6409 au nt 6636) a été quantifiée (amorces: sens CATCCCTTGACATCGTG, antisens CTGAGTAGCGTCGTGG) et normalisée sur la quantité de ADN nucléaire, nDNA, calculée en utilisant la séquence du gène nucléaire codant la sous-unité 18S du ribosome (amorces : sens CGGACAGGATTGACAGA ; antisens : CCAGTCAGTGTAGCGC). Le calcul du rapport mtDNA/nDNA donne la valeur finale de la quantité relative en ADN mitochondrial pour un échantillon donné.

Dans mes expériences faites sur un modèle BACHD, non incluses dans les résultats publiés, j'ai aussi quantifié par qRT-PCR les ARN correspondant aux transcrits des gènes codants les facteurs et cofacteurs de transcription PGC-1 α , NRF-1, TFAM et la protéine β -actine, utilisée pour la normalisation. A cette fin j'ai utilisé les amorces spécifiques suivantes :

PGC-1 α , sens: ATACACAACCGCATCGGCAA;

antisens: AAGGTTTCGCTCAATAGTCTTGTTTC

NRF 1, sens: AAGAAACGGAAACGGC;

antisens: GCTCTTGTACTTTTCGCAC

TFAM, sens: AGGCTTGGAAAAATCTGTCTC;

antisens: TGCTCTTCCCAAGACTTCATT

β -actine: sens: GGCCAACCGTGAAAGATGA;

antisens: GCCTGGATGGCTACGTACATG.

Environ 50 ng de cDNA ont été utilisés dans chaque essai (exécuté en *triplicata*). Le rapport entre la quantité du transcrit du gène cible et le transcrit correspondant à la β -actine a été calculé et correspond à la quantité relative du transcrit en question dans un échantillon donné.

VII.3.2.c Caractérisation d'un modèle de rat basé sur le transfert intrastriatal du transgène codant le fragment N171- de la HTT sauvage (18Q) ou mutée (82Q), à l'aide des vecteurs lentiviraux.

Dans ce modèle nous avons évalué l'effet direct de la surexpression de la HTT mutée sur la survie neuronale et l'expression striatale de sous-unités Fp et Ip du Co II. Dans une deuxième étape, ces mêmes sous-unités ont été co-surexprimés avec la HTT mutée, afin d'évaluer un possible effet neuroprotecteur.

Production des vecteurs

Les cDNAs, codant la protéine GFP (Regulier E *et al.*, 2002) ou le fragment N171 de la protéine HTT humaine, avec 18 ou 82 répétitions CAG, (de Almeida LP *et al.*, 2002) ont été clonées dans des vecteurs SIN contenant l'élément post-régulateur Woodchuck du virus de l'hépatite (W) (Deglon N *et al.*, 2000). Le promoteur PGK1 murin est le promoteur interne (Fig. 43).

La méthode du phosphate de calcium a été utilisée pour transfecter de manière transitoire les cellules 293T avec les particules virales (Ory DS *et al.*, 1996). Quarante huit heures après la transfection les surnageants ont été collectés, filtrés, et concentrés par ultracentrifugation. Le contenu en particules virales est quantifié par détermination de la concentration de l'antigène viral p24 (ELISA, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). La préparation est portée à une concentration de 200.0000 ng de p24/ μ l dans un volume de PBS (0,1 M) contenant de l'ASB (1%).

Injection stéréotaxique

L'injection intrastriatale a lieu sur l'animal anesthésié et placé dans le cadre stéréotaxique, à l'aide d'un injecteur automatique. Les coordonnées utilisées pour l'injection sont : 0.8 mm rostral au bregma, 3.5 mm latéral à la ligne médiane et 4.0 mm ventral à la surface du crâne (Diguët E *et al.*, 2009). La vitesse d'injection est de 0.25 μ l/min.

Sacrifice des animaux et préparation des tissus

Selon le type d'analyse souhaité, le sacrifice des animaux se déroule de façon différente. Après anesthésie profonde obtenue par l'administration d'une 'overdose' de penthiobarbital de Sodium, nous avons suivi trois types de protocoles pour la préparation des tissus.

1- Après décapitation de l'animal, le cerveau est excisé et congelé immédiatement dans de l'isopentane maintenu à -25 °C. Les cerveaux sont gardés à -80 °C jusqu'au moment de la préparation des sections. Des sections coronales de 20 μ m ont été coupées à l'aide d'un cryostat maintenu à -22 °C. Les sections ainsi préparées sont

viables pour les analyses de la fluorescence des régions infectées et pour les analyses histoenzymatiques des activités des Complexes II et IV.

- 2- Après anesthésie profonde, la perfusion transcardiaque de l'animal est effectuée avec une solution de PBS (0.1%) contenant de la paraformaldéhyde (4%), pour une durée de 4 minutes. Les cerveaux des animaux perfusés sont ensuite excisés et immergés pour la postfixation dans une solution de PBS (0.1%) contenant de la paraformaldéhyde 4%. Ils sont en suite immergés dans une solution cryoprotectrice contenant du sucrose 30% pendant 48h, suivies de la congélation à -20°C jusqu'au moment de la préparation des sections. Des sections coronales de 40 µm sont ensuite préparées à l'aide d'un microtome maintenu à -22 °C. Ce protocole permet de préparer des sections viables pour les analyses immunohistochimiques.
- 3- Après anesthésie profonde, le cerveau est excisé et placé dans une matrice pour rats, maintenue sur la glace (4 °C). Une section coronale de l'épaisseur de 1 mm, correspondant à la région striatale, est coupée et immédiatement posée sur le plan focal du microscope à épifluorescence (objectif 5x) afin de repérer, par détection de la fluorescence, la zone du striatum infectée dans laquelle les vecteurs se sont propagés. Cette zone est coupée sous le microscope avec un emporte-pièce ou 'punch' d'un diamètre de 1.5 mm (Fig. 44). Les fragments de tissus ainsi obtenus sont ensuite soumis à l'extraction des protéines et l'analyse par *western blot*.

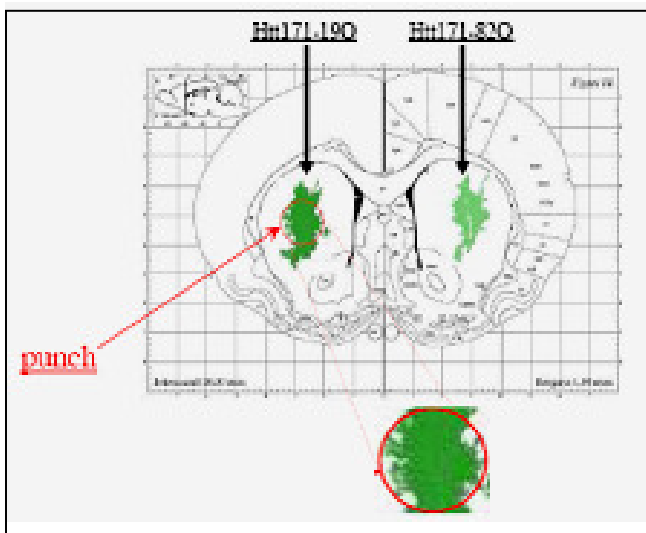


Figure 44 : Illustration de la procédure de dissection de la région striatale infectée par un vecteur lentiviral (méthode 3).

VII.4 Résultats

La HTT mutée se localise au noyau, où par ses nouvelles propriétés, dérivant de la présence de l'expansion pathologique du domaine polyQ, elle pourrait interférer avec les programmes transcriptionnels contrôlant la fonction mitochondriale et nécessitant le fonctionnement coordonné des deux génomes. De plus, étant retrouvée associée à la mitochondrie, la HTT mutée pourrait altérer directement la fonction mitochondriale.

En faveur de ces hypothèses, nous avons retrouvé des défauts de la fonction mitochondriale dans les trois modèles explorés.

Dans les souris R6/1 nous avons mis en évidence, au niveau striatal, une diminution de la quantité des sous-unités Fp et Ip du Co II de la chaîne respiratoire, par rapport aux souris contrôles, la diminution de la sous-unité Ip étant plus importante et significative (Article, fig. 1).

Les analyses de la fonction de mitochondries isolées à partir des cerveaux de souris N171-82Q indiquent la présence de différents types d'anomalies.

Par la respirométrie, j'ai pu constater qu'à partir de l'âge de deux mois, les mitochondries des souris transgéniques pour la HTT mutée présentent une diminution significative de l'état 3 de la respiration, spécifiquement en présence de succinate, substrat du Co II (Article, fig. 2C). A cet âge, il n'est pas possible de mettre en évidence des différences entre souris transgéniques et souris sauvages en présence de substrats du seul Co I, ce qui devient possible seulement dans les souris âgées de trois mois.

A la suite de cette observation j'ai décidé d'explorer l'organisation moléculaire des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, par la méthode BN-PAGE. Les informations fournies par la méthode du *western blot* concernant les niveaux totaux des protéines constituant les complexes sont utiles mais ne permettent pas de conclure quant au fonctionnement de la chaîne respiratoire, car elles ne révèlent pas la quantité de protéines effectivement intégrées dans les complexes. La méthode BN-PAGE offre l'avantage d'évaluer les complexes assemblés dans leur conformation native.

Cette analyse a montré une diminution du Co II dans les mitochondries des souris N171-82Q par rapport aux souris non transgéniques à partir de l'âge de deux mois. Ce défaut

persiste dans les souris de trois mois, lorsqu'il est accompagné par un défaut du Co IV (non montré).

Une diminution plus précoce du Co II, suivie d'une diminution du Co IV est visible déjà à partir de l'âge d'un mois, lorsqu'on confronte les mitochondries isolées de souris N171-82Q avec celles isolées de souris N171-18Q (Article, fig 2A et 2B). L'apparition plus précoce de ce défaut dans la confrontation entre les deux types de souris transgéniques pour le fragment N171 de la HTT, sauvage ou mutée, indique en effet que la présence de ce fragment a un impact sur la physiologie mitochondriale déjà dans sa forme sauvage et détermine des changements opposés à ceux causés par la HTT mutée.

Les gènes codant les sous-unités et les facteurs d'assemblage du Co II résident dans le noyau et leur expression est contrôlé par les activateurs et coactivateurs nucléaires dont la fonction, comme on l'a expliqué dans la section VI relative à la physiologie mitochondriale, est à son tour sensible à l'état bioénergétique de la cellule ; l'expression et la fonctionnalité de ce complexe sont donc considérées comme indicatives de la coordination entre les deux génomes, nucléaire et mitochondriale. D'après ces résultats, j'ai ensuite retenu important d'explorer la biogenèse mitochondriale, un autre paramètre indicatif de cette coordination intergénomique, par la mesure de la quantité relative d'ADN mitochondrial dans différentes régions du cerveau des souris.

La quantification du contenu relatif d'ADN mitochondrial dans les échantillons de striatum dérivés des souris N 171-82Q a confirmé mon hypothèse que les défauts spécifiques du Co II de la chaîne respiratoire au cours de la progression de la maladie s'accompagnent, dans ce modèle, d'une réduction progressive de la biogenèse mitochondriale (Article fig 2D).

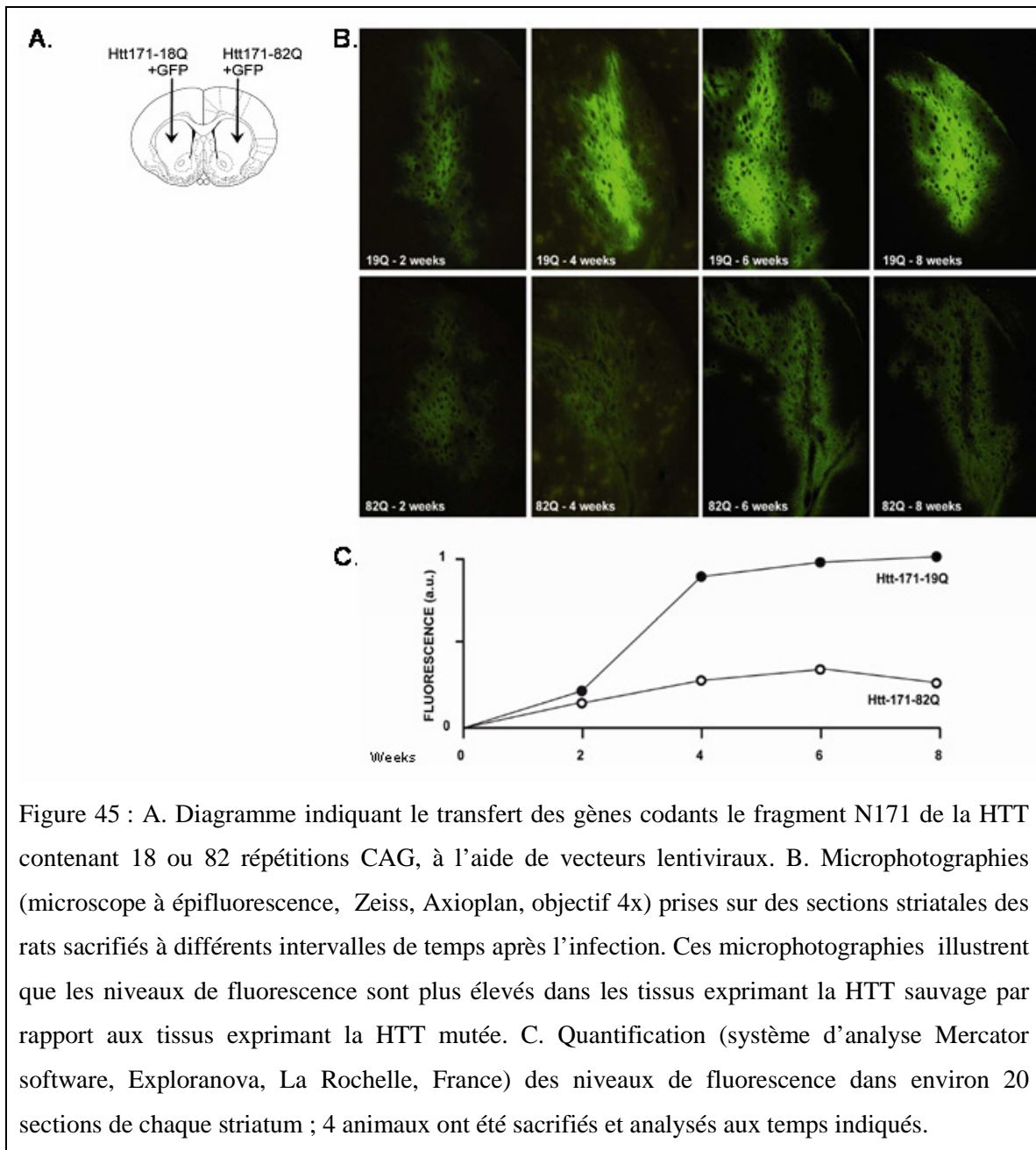
Lorsque j'ai rejoint l'équipe du Dr Brouillet au CEA j'ai eu la possibilité de travailler sur le modèle de rat de MH, généré utilisant le transfert de gènes par vecteur viral pour obtenir la production intrastriatale du fragment N171-82Q. Ce modèle reproduit les principales caractéristiques neuropathologiques de la MH, y compris les inclusions intracléaires de HTT et l'atrophie striatale progressive. Il est préférable au modèle basé sur un vecteur adénoviral, peu utilisé à cause de la tendance de ce type de vecteur à déclencher des réactions inflammatoires. Le lentivirus PGK1-HTT171-82Q utilisé

conduit au développement rapide et reproductible de la maladie. Ce vecteur a été utilisé dans de nombreuses études s'intéressant à la MH (Perrin *et al.*, 2007; Perrin *et al.*, 2009; Diguët E *et al.*, 2009; Faideau *et al.*, 2010).

Résultats préliminaires à ma recherche

L'utilisation simultanée d'un lentivirus exprimant la GFP et d'un lentivirus exprimant la HTT permet de visualiser directement la zone infectée après l'injection.

La caractérisation préliminaire de ce modèle, nous a indiqué que la toxicité provoquée par la HTT mutée peut être estimée par l'analyse du niveau de fluorescence. Ceci correspond en effet à la diffusion des particules virales (hautement neurotropiques) dans les neurones, et représente un outil pour suivre l'évolution de la neurodégénérescence striatale. Ainsi, une augmentation progressive des niveaux de fluorescence a été montrée entre 2 et 8 semaines après l'injection intrastriatale d'un vecteur codant le fragment N171-18Q. Les niveaux de fluorescence restent, au contraire, toujours très faibles lors de l'infection d'un vecteur codant le fragment N171-82Q (Fig. 45).



Le plan de travail effectué sur les rats comprend plusieurs étapes supplémentaires, comme il est schématisé dans la figure 3 de l'article et reporté ici (Fig. 46).

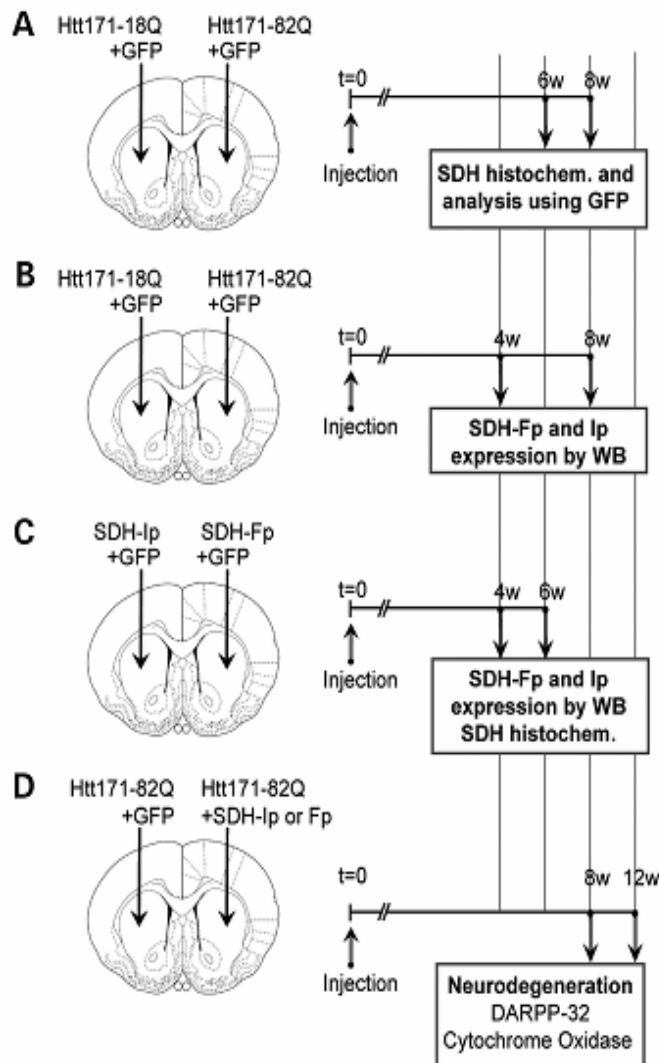


Figure 46 : plan de travail sur le modèle de rat basé sur l'expression striatale du fragment N171-82Q de la HTT mutée obtenue par transfert de gène à l'aide d'un lentivirus. Les quatre diagrammes schématisent les étapes fondamentales pour la réalisation de notre recherche. Le calendrier des expériences est adapté à plusieurs types de contraintes, y compris de l'exécution des manœuvres de chirurgie stéréotaxique et les longs temps d'attente entre l'injection et le sacrifice des animaux pour l'analyse des échantillons. Chaque étape a été conçue de manière indépendante des autres : l'analyse des paramètres indiqués dans les rectangles à droite est faite dans chaque étape par comparaison des striata de deuxemisphères cérébraux.

Développement du plan expérimental (Fig. 46, article fig 3)

A. Caractérisation de l'activité du Co II de la chaîne respiratoire mitochondriale par la méthode d'analyse histoenzymatique sur coupes congelées (préparation 1, coupes des cerveaux congelés).

L'analyse faite sur les coupes individuelles nous a montré une diminution significative de l'activité du Co II suite à l'infection intrastriatale par un lentivirus codant le fragment N171-82Q (Article, fig 4).

Nous avons ensuite réalisé une analyse par reconstruction tridimensionnelle. Les images ont été digitalisées (voir section 'méthodes' de la publication) afin d'obtenir une

reconstruction tridimensionnelle des volumes correspondant à la zone où la perte de l'activité du Co II est observée, par rapport aux volumes couverts par l'infection virale. L'intégration de ces informations permet une plus correcte évaluation de la perte de l'activité du complexe, là où la HTT mutée est effectivement exprimée (Article, fig 5).

B. Des extraits de protéines striatales ont été préparés à partir de fragments de tissus obtenus comme décrit dans la section méthodes (préparation 3 ; 'punch' sur tissu frais).

Six semaines après l'injection intrastriatale des lentivirus codant les fragments N171-82Q ou -18Q, l'évaluation par *western blot* de l'expression des sous-unités du Co II de la chaîne respiratoire nous a indiqué que la production intrastriatale du fragment N171-82Q suffit à causer une diminution des niveaux des sous-unités Fp et Ip (Article, fig 6).

C. Nous avons ensuite évalué l'efficacité et la spécificité des lentivirus codant les sous-unités Fp et Ip. Des extraits de protéines striatales ont été préparés à partir de fragments de tissus obtenus comme décrit dans la section méthodes (préparation 3 ; 'punch' sur tissu frais). Comme mis en évidence par *western blot*, l'infection intrastriatale des lentivirus codant les sous-unités Fp ou Ip cause en effet une augmentation des niveaux de ces sous-unités (Article, fig 7) en absence de modifications de l'activité du complexe vue par l'essai histoenzymatique (Article, fig S1)

D. Cette dernière étape du plan de travail vise à évaluer si la stratégie de transfert de gènes par lentivirus peut être utilisée pour cibler la mitochondrie et contrecarrer directement la toxicité mitochondriale et neuronale causée par la HTT mutée.

L'étendue de la lésion provoquée par la présence de HTT mutée exogène, seule ou en association avec les sous-unités exogènes Fp et Ip du Co II, a été quantifiée utilisant le marquage pour la protéine striatale DARPP32 (préparation 1 : immunohistochimie sur coupes de cerveaux perfusés) et l'évaluation histoenzymologique de l'activité du Co IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une diminution significative de l'étendue de la lésion et l'augmentation des niveaux d'activité de la COX témoignent de l'efficacité de la stratégie lentivirale pour transférer les gènes codants pour les sous-unités Fp et Ip et obtenir une neuroprotection du striatum vis-à-vis de la toxicité de la HTT mutée (Article, fig 8). Le nombre, la quantité par surface analysée, et la taille des agrégats contenant la HTT mutée n'étaient pas modifiés par la surexpression des sous-unités Fp et Ip (Article, fig S2).

VII.5 Discussion et perspectives

Effet neuroprotecteur des sous-unités du Co II

Nous avons montré que, chez les rongeurs, la présence de défauts d'expression et de fonction du Co II de la chaîne respiratoire mitochondriale est la conséquence de l'expression des fragments N-terminaux de la HTT mutée. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédemment effectués par Benchoua et collaborateurs *in vitro* (Benchoua A *et al.*, 2006 and 2008). Nos données concernant l'impact *in vivo* de la HTT mutée sur l'activité du Co II sont originelles ; de plus, l'effet de neuroprotection observé utilisant une stratégie de transfert de gène modulant l'expression de sous-unités du Co II, en particulier de la sous-unité Ip, fournit la preuve de concept que la modulation de l'expression des protéines mitochondriales peut être considérée, en perspective, pour des applications thérapeutiques. Nous avons aussi montré que la survie neuronale ne corrèle pas avec une modification des caractéristiques des agrégats contenant la HTT mutée. Ces résultats suggèrent, en accord avec des études précédentes que la présence des agrégats ne marque pas la progression de la perte neuronale (Saudou F *et al.*, 1998; Arrasate M *et al.*, 2004;) ; elle pourrait représenter une stratégie adoptée par la cellule afin de limiter les effets toxiques de la HTT mutée.

Les défauts du cycle de Krebs sont ils des défauts des deux génomes ?

De l'étude du modèle N171-82Q, il émerge que la déplétion de l'ADN mitochondrial striatal est concomitante au défaut du Co II précocement au cours du développement du phénotype pathologique ; cette observation suggère un défaut plus général des fonctions mitochondriales contrôlées par le génome nucléaire.

De façon intéressante, des études précédentes ont lié les défauts du cycle de Krebs à l'homéostasie de l'ADN mitochondrial : chez l'homme, un défaut de l'enzyme succinyl-CoA ligase du cycle Krebs - qui catalyse de manière réversible la formation de succinate et ATP à partir de succinyl-CoA et ADP -, causé par des mutations pathogéniques du gène *SUCLA2*, s'associe à la déplétion de l'ADN mitochondrial et à un phénotype pathologique d'encéphalomyopathie (Elpeleg O *et al.*, 2005).

Dans la discussion de notre article nous avons souligné que les résultats de l'analyse de transcrits des gènes codants les sous-unités Fp et Ip excluent la présence d'un défaut de la

transcription de ces gènes. La dysfonction du Co II pourrait avoir lieu suite à la mise en place de mécanismes post-transcriptionnels modifiant le 'turnover' ou la fonctionnalité des protéines constituant le complexe. Ainsi le 'turnover' des sous-unités Fp (ou SDHA) et Ip (ou SDHB) pourrait jouer un rôle dans la stabilité du Co II, ce qui pourrait être approfondi, par exemple par des expériences de 'pulse-chase' ; ceci pourrait être utile afin d'explorer les mécanismes qui sous-tendent l'effet neuroprotecteur de ces protéines. Plusieurs facteurs additionnels, réglés dans le noyau, méritent aussi d'être étudiés pour définir les mécanismes déterminant le défaut du Co II dans les modèles MH. Outre que sur les sous-unités catalytiques, l'assemblage et la fonction de ce complexe s'appuient sur les sous-unités C et D, pour l'ancrage à la membrane mitochondriale interne. De plus, deux facteurs accessoires ont été récemment identifiés, SDHAF1 et SDHAF2, importants dans l'assemblage et la stabilité du complexe et, par conséquent, de sa fonctionnalité (Ghezzi D *et al.*, 2009; Hao HX *et al.*, 2009).

Co-régulation du Co II et du Co IV

En plus du défaut du Co II, j'ai mis en évidence un défaut de l'assemblage et de l'activité du Co IV dans le cerveau des souris N171-82Q à des âges avancées, par la méthode BN-PAGE. Le défaut du Co IV est donc chronologiquement subordonné au défaut du Co II et de l'ADN mitochondrial.

Des études de physiologie mitochondriale ont en effet établi qu'un des mécanismes clés pour le contrôle de la respiration mitochondriale réside dans la régulation de l'activité du Co IV. Ce mécanisme est représenté par la dynamique des changements entre deux états fonctionnels du métabolisme énergétique, un état 'relaxé', caractérisé par la production de bas niveaux de EROs, et un état 'excité' caractérisé par l'augmentation de la production des EROs (revu dans Ludwig B *et al.*, 2001). Le passage d'un état fonctionnel à l'autre a lieu par la modulation de l'activité du Co IV : l'activité de ce complexe peut être inhibée allostériquement par l'ATP, lorsque le rapport ATP/ADP intramitochondrial est élevé. Cette inhibition sert physiologiquement au maintien de faibles niveaux de production d'EROs. Le commutateur moléculaire de ce mécanisme de régulation est représenté par la phosphorylation dépendante de l'AMP cyclique de certaines sous-unités du complexe ; de manière spéculaire, la déphosphorylation, dépendante du

calcium, des mêmes sous-unités favorise l'état 'excité' de l'enzyme et de la respiration mitochondriale, et par conséquent des taux de production de EROs plus élevés (revu dans Ludwig B *et al.*, 2001).

Au vue de l'interdépendance entre l'activité du Co IV et la production des EROs et depuis la découverte récente de la contribution de l'activité du Co II à la production intramitochondrial de EROs (Quinlan CL *et al.*, 2012; Siebels I and Drose S, 2013) on pourrait soupçonner que dans le modèle N171-82Q l'inhibition et la diminution de l'expression et de l'assemblage du Co IV puisse être la conséquence d'un dysequilibre de la production des EROs provoquée par un défaut du Co II et que la HTT mutée puisse avoir un impact important sur le mécanisme de co-régulation entre le Co II et le IV (Fig. 47). En perspective, l'approfondissement de ce mécanisme est de première importance même en dehors du contexte de la neurodégénérescence. *In vitro*, dans des lignées cellulaires et dans les neurones il serait intéressant d'explorer si et comment la modulation de la production de EROs par le Co II affecte la biogenèse mitochondriale et l'expression du Co IV et dans quelle mesure la HTT, dans sa forme mutée ou sauvage, participe à ces mécanismes.

Le succinate et la neuroinflammation

Très récemment Tannahill et ses collaborateurs ont démontré que le succinate est un médiateur de la neuroinflammation (Tannahill GM *et al.*, 2013). Comme il a été discuté dans la section IV du chapitre 1, la neuroinflammation joue un rôle déterminant dans le maintien et la progression de la neurodégénérescence au cours de plusieurs maladies, y compris la MH (pour revue Moller T, 2010). Par la surexpression des sous-unités du Co II, nous avons obtenu un effet de neuroprotection significatif. Si cette neuroprotection relève de la compensation du défaut bioénergétique observé ou de l'amélioration du métabolisme du succinate - c'est-à-dire de la prévention de l'accumulation de ce métabolite et de l'amélioration la neuroinflammation secondaire à la présence de la HTT mutée – alors, c'est une question qui mérite d'être approfondie. *In vivo* et *in vitro*, par exemple, les changements induits par la HTT mutée et en réponse à la surexpression des sous-unités Fp et Ip sur la prolifération gliale et la concentration des médiateurs inflammatoires, pourraient être investigués.

Deux faits intéressants méritent une mention dans le contexte de la neuroinflammation.

1- L'effet de l'accumulation du succinate implique la stabilisation du facteur HIF-1 α (pour Hypoxia Induced Factor 1 α) qui serait responsable de la stabilisation et de l'augmentation des médiateurs de l'inflammation, comme IL-1 β et IL-6 (Tannahill GM *et al.*, 2013). D'autre part, HIF-1 α est aussi impliqué dans la régulation de l'expression des sous-unités du Co IV (Fukuda R *et al.*, 2007).

2- Le NO produit en excès par la microglie activée est un important régulateur de la fonction mitochondriale, par inhibition du Co IV (Giulivi C, 1998 and 2007; Nisoli E and Carruba MO 2006).

Ces deux considérations pourraient fournir des indications additionnelles sur les possibles mécanismes soutenant la corégulation entre Co II et Co IV que nous avons observée. La figure suivante (Fig. 47) résume ces mécanismes.

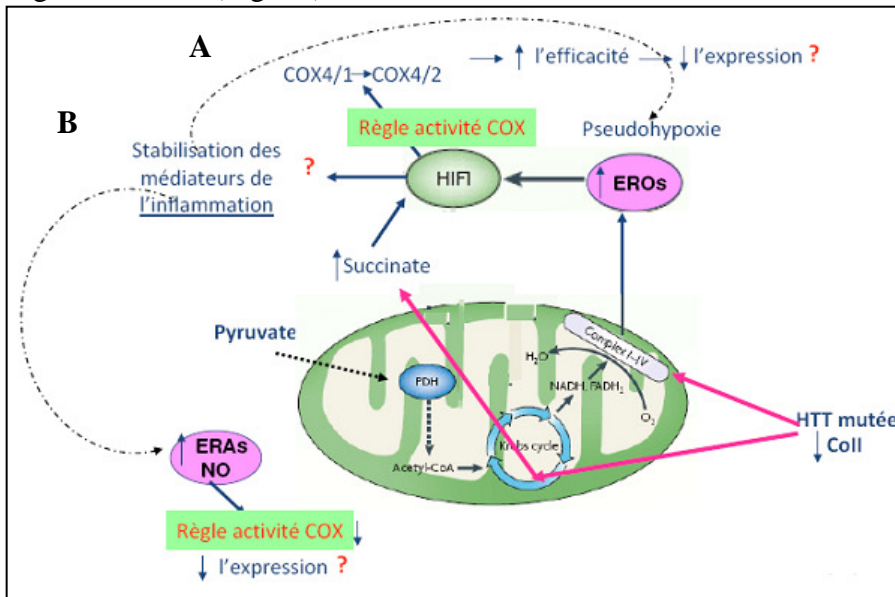


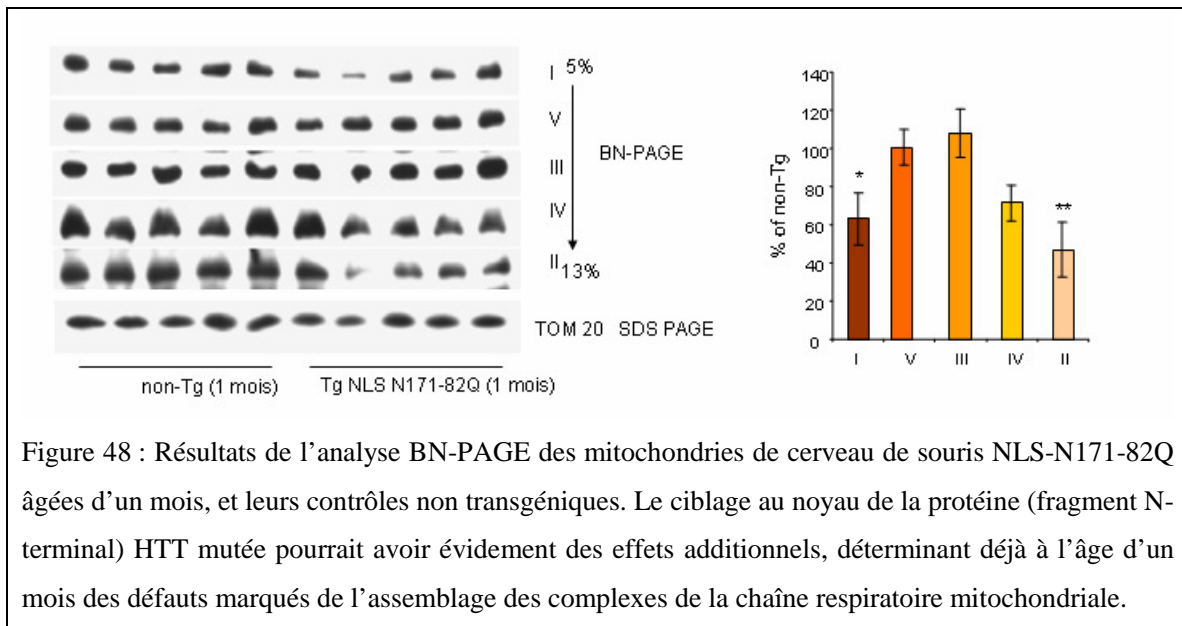
Figure 47 : Schéma représentatif des voies métaboliques potentielles impliquées dans la coregulation CoII-CoIV. La HTT mutée, directement, par un impact sur l'activité Co II de la chaîne respiratoire, ou indirectement

par la stabilisation des médiateurs de l'inflammation consécutive à l'accumulation du succinate, pourrait affecter la bioénergétique mitochondriale, et ainsi augmenter le stress oxydant et la production des EROs. Dans ces conditions deux possibles scénarios sont envisageables. A : la stabilisation du facteur HIF pourrait être responsable d'un changement dans la composition en sous-unités du CoIV, augmentant la production de la sous-unité COX4/2 plus efficace que la sous-unité COX 4/1. La diminution de l'expression du CoIV serait, dans ce cas, une réponse compensatoire à l'augmentation de l'activité du complexe. B. L'augmentation de la production de NO par les cellules gliales impliquées dans les mécanismes de neuroinflammation pourrait directement affecter l'activité et donc l'expression du Co IV.

VII.6 Données supplémentaires et remarques de conclusions

Dans cette section je résume les résultats d'expériences additionnelles effectuées dans des modèles supplémentaires.

1- Chez les souris NLS-N171-82Q âgées d'un mois des défauts de l'assemblage de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont mis en évidence par BN-PAGE. En accord avec les résultats obtenus chez la souris N171-82Q, la diminution de l'assemblage du Co II est le défaut plus prononcé (Fig. 48)



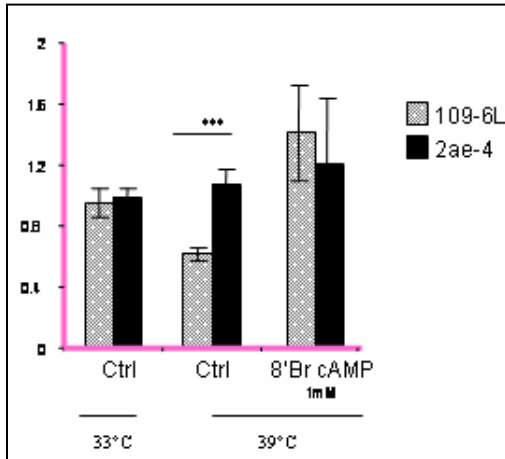
2- J'ai aussi analysé un modèle de cellules striatales dérivées de progéniteurs neuronaux striataux immortalisés des souris KI *Hdh*^{Q111} homozygotes, les cellules STHDH^{Q111} (Trettel F *et al.*, 2000).

Chez les souris KI *Hdh*^{Q111} la mutation humaine a été insérée dans le locus du gène murin codant la HTT (Wheeler VC *et al.*, 2000). Ces souris expriment donc la forme entière de la HTT mutée avec une expansion de 111 résidus de glutamine ; elles exhibent des anomalies neuronales précoces, sélectives pour les MSNs du striatum, telles que l'accumulation de la HTT mutée entière dans les noyaux des cellules. Dans ce modèle la signalisation dépendante de CRE (pour Cyclic AMP, AMPc, Responsive Element) s'est révélée déficitaire, avec des taux réduits de BDNF cortical et striatal, de AMPc de CREB et de phospho CREB (Gines S *et al.*, 2003). Dans les cellules STHDH^{Q111} au défaut décrit

de cette signalisation s'associent des défauts bioénergétiques : une altération du rapport ATP/ADP et une sensibilité accrue aux toxines mitochondriales (Gines S *et al.*, 2003).

Les cellules STHDH^{Q111} ont été immortalisés, de façon conditionnelle, par un mutant thermosensible (TS) de l'oncogène du virus simien SV 40 : l'exposition à des températures hautes (39°C) cause la perte de fonction de l'antigène TS SV40 et la cessation de leur prolifération (Trettel F *et al.*, 2000). La thermo-sensibilité caractéristique de ce modèle m'a permis d'explorer la biogenèse mitochondriale dans les deux phases, mitotique et post-mitotique. J'ai ainsi démontré qu'un défaut de la biogenèse mitochondriale apparaît sélectivement dans le clone exprimant la forme mutée de la HTT, lorsque les cellules sortent du cycle réplcatif et deviennent post-mitotiques. Dans ces expériences l'ajout au milieu de culture de 8'Br AMPc annule le défaut de la biogenèse mitochondriale, en accord avec l'hypothèse de la présence d'une signalisation aberrante de CRE (Fig. 49). Ces résultats sont importants en deux aspects : en première instance ils indiquent que la présence d'un défaut de la biogenèse mitochondriale est commun aux modèles exprimant la forme entière comme au modèles exprimant les fragments N-terminaux de la HTT mutée ; en deuxième instance ils indiquent une corrélation entre la présence des défaut mitochondriaux et le cycle cellulaire, cette remarque est importante lorsque on considère la nature postmitotique des neurones.

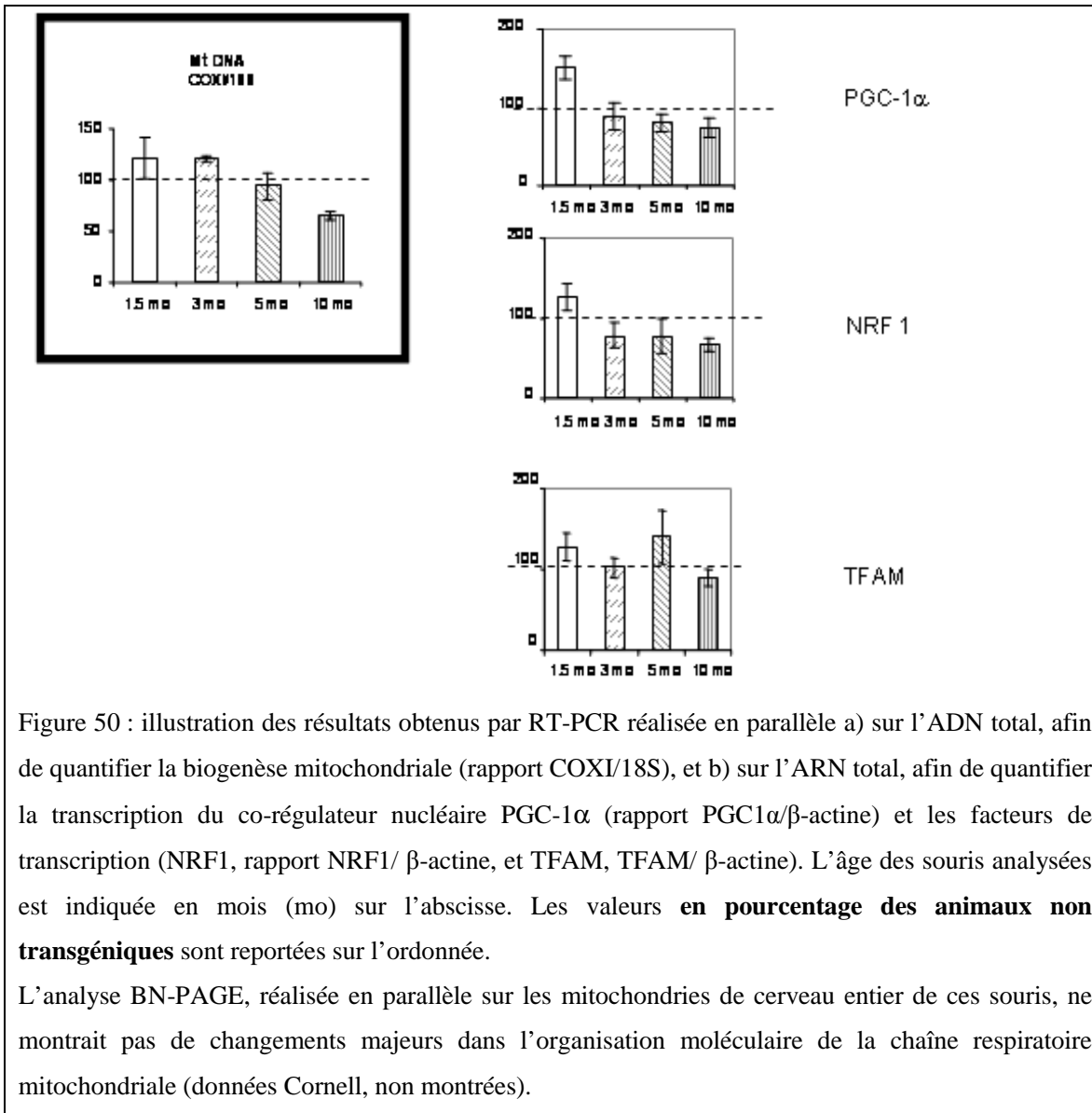
Figure 49 : quantification de l'ADN mitochondrial dans la lignée cellulaire STHDH^{Q111}, cellules striatales dérivées des souris KI correspondantes. Dans des conditions de culture permissives (33°C), les clones indiqués, 109-6L (HTT mutée) et 2ae-4 (HTT sauvage), ne montrent pas de différences du contenu relatif d'ADN mitochondrial.



L'application de conditions plus restrictives (incubation à 39°C pour 12h) implique la cessation de leur prolifération. Dans ces conditions une différence significative entre les deux clones est mise en évidence en ce qui concerne la quantité d'ADN mitochondrial. L'ajoute de AMPc, au milieu de culture, pendant les 12h d'incubation à 39°C, stimule la prolifération mitochondriale, annulant les différences entre les deux clones.

3- L'analyse de la biogenèse mitochondriale et des facteurs de transcription mitochondriaux sont deux aspects de la physiologie mitochondriale qui, comme on l'a vu dans la section VI, sont interdépendants et corrélés à l'activation des programmes transcriptionnels au niveau nucléaire.

Dans un modèle BACHD, j'ai étudié le contenu en ADN mitochondrial en différents tissus cérébraux en parallèle à l'analyse des transcrits des principaux facteurs de transcription (Fig. 50). J'ai constaté que dans ce modèle la diminution progressive du contenu relatif en ADN mitochondrial striatal correspond à une diminution progressive de l'expression des facteurs nucléaires PGC-1 α et NRF1.



VII.6.1 Remarques de conclusion

D'après les travaux qui suggèrent que la localisation mitochondriale de la protéine mutée (Panov AV *et al.*, 2002) est importante dans l'apparition de la dyshoméostasie calcique mitochondriale, on aurait pu attribuer le défaut du Co II observé à un effet toxique direct de la HTT mutée sur la mitochondrie. Toutefois, la constatation qu'un défaut de l'assemblage du Co II est présent dans les mitochondries isolées du cerveau des souris NLS-N171-82Q (Fig. 45) nous a indiqué que effectivement la localisation nucléaire du fragment N-terminal de la HTT mutée est déterminante pour l'apparition de ce défaut.

Je n'ai pas pu révéler le défaut du Co II dans les mitochondries cérébrales des souris BACHD ; je n'ai pas eu, cependant, la possibilité d'exclure qu'un défaut sélectif, confiné au striatum, puisse être présent chez ce modèle.

La déplétion en ADN mitochondrial semble être le facteur uniformément présent dans les modèles étudiés. Ce défaut semble être spécifique pour le striatum : le cervelet et le cortex des souris N171-82Q, par exemple, ne montrent pas une baisse significative des niveaux d'ADN mitochondrial dans le cervelet ou le cortex (données non montrées). Chez les souris BACHD j'ai aussi eu la possibilité d'explorer la présence de défauts dans la voie de régulation de la biogenèse mitochondriale, par la quantification des transcrits de PGC-1 α , NRF1 et Tfam. J'ai ainsi pu vérifier qu'effectivement la déplétion en ADN mitochondrial est associée au déclin progressif de PGC-1 α et du facteur de transcription réglé en aval, Nrf1.

L'étude de ces facteurs aurait pu compléter ma caractérisation du modèle N171-82Q. Depuis mon arrivée en France en 2008 je n'ai plus eu la possibilité de travailler sur le modèle de souris transgéniques pour des fragments N-terminaux de la HTT mutée, pourtant la production scientifique de mon ancien superviseur, le Prof Beal, et de ses collaborateurs a amplement confirmé la présence de défauts de l'activité de PGC-1 α dans le modèle NLS-N171-82Q (Chaturvedi RK *et al.*, 2009; Chaturvedi RK *et al.*, 2010; revu dans Johri A *et al.*, 2013).

En conclusion, de mes expériences j'ai pu constater que la HTT mutée a un impact sur différents aspects de la physiologie mitochondriale, comme l'assemblage et la fonctionnalité de la chaîne respiratoire, la transcription et la biogenèse mitochondriale. Dans tous les modèles analysés, j'ai pu constater que la HTT mutée peut interférer avec la fonctionnalité des deux génomes, nucléaire et mitochondriale.

Mes résultats me portent à penser que la présence des fragments N-terminaux soit déterminante en ce qui concerne l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire,

VII.7 Article 1

A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin

Maria Damiano^{1,2,3,†}, Elsa Diguet^{1,2,3,†}, Carole Malgorn^{1,2}, Marilena D'Aurelio³, Laurie Galvan^{1,2}, Fanny Petit^{1,2}, Lucile Benhaim^{1,2}, Martine Guillemier^{1,2}, Diane Houitte^{1,2}, Noelle Dufour^{1,2}, Philippe Hantraye^{1,2}, Josep M. Canals⁴, Jordi Alberch⁴, Thierry Delzescaux^{1,2}, Nicole Déglon^{1,2,‡}, M. Flint Beal³ and Emmanuel Brouillet^{1,2,*}

¹CEA, DSV, ²BM, Molecular Imaging Research Center (MIRGen), Fontenay-aux-Roses F-92265, France, ³CNRS, CEA URA 2210, Fontenay-aux-Roses F-92265, France, ⁴Department of Neurology and Neuroscience, Weill Cornell Medical College, Cornell University, New York, NY, USA and ⁵Department of Cell Biology, Immunology and Neuroscience, Medical School, IDIBAPS, CIBERNED, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received February 12, 2013; Revised and Accepted May 23, 2013

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by an abnormal expansion of a CAG repeat encoding a polyglutamine tract in the huntingtin (Htt) protein. The mutation leads to neuronal death through mechanisms which are still unknown. One hypothesis is that mitochondrial defects may play a key role. In support of this, the activity of mitochondrial complex II (C-II) is preferentially reduced in the striatum of HD patients. Here, we studied C-II expression in different genetic models of HD expressing N-terminal fragments of mutant Htt (mHtt). Western blot analysis showed that the expression of the 30 kDa Iron–Sulfur (Ip) subunit of C-II was significantly reduced in the striatum of the R6/1 transgenic mice, while the levels of the FAD containing catalytic 70 kDa subunit (Fp) were not significantly changed. Blue native gel analysis showed that the assembly of C-II in mitochondria was altered early in N171-82Q transgenic mice. Early loco-regional reduction in C-II activity and Ip protein expression was also demonstrated in a rat model of HD using intrastriatal injection of lentiviral vectors encoding mHtt. Infection of the rat striatum with a lentiviral vector coding the C-II Ip or Fp subunits induced a significant overexpression of these proteins that led to significant neuroprotection of striatal neurons against mHtt neurotoxicity. These results obtained *in vivo* support the hypothesis that structural and functional alterations of C-II induced by mHtt may play a critical role in the degeneration of striatal neurons in HD and that mitochondrial-targeted therapies may be useful in its treatment.

INTRODUCTION

For reasons that are still unclear, the striatum is preferentially damaged in a number of acute and chronic pathological conditions, leading to devastating cognitive deficits and abnormal movements (1). The most studied of these illnesses is Huntington's disease (HD).

HD is a dominantly inherited disorder generally affecting young adults. Symptoms include involuntary abnormal movements (chorea, dyskinesia, dystonia), frontal cognitive deficits (e.g. alterations of adaptation) and psychiatric disturbances (2). The disease is fatal ~15 years after the onset of symptoms. There is no treatment available to slow the progression of this devastating disorder.

*To whom correspondence should be addressed at: Neurodegenerative Disease Laboratory, URA CEA-CNRS 2210, Molecular Imaging Research Center, CEA, 18 route du Panorama, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. Tel: +33 146549622; Fax: +33 146549116; Email: emmanuel.brouillet@cea.fr

[†]The first two authors contributed equally to the present study.

[‡]Present address: Lausanne University Hospital, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, CH-1011 Lausanne, Switzerland.

© The Author 2013. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

HD is caused by a mutation in the gene encoding the protein huntingtin (Htt) that consists in a CAG triplet repeat expansion translated into an abnormal polyglutamine (polyQ) tract within the N-terminal region of the protein (3). While mutant Htt (mHtt) protein is ubiquitously expressed in the brain, degeneration primarily affects the striatum (4).

Mechanisms of HD pathogenesis are likely multifactorial. The polyQ expansion in mHtt produces a gain of function that is toxic to neurons through several mechanisms. One major early event in HD is the alteration of transcription (5). Other early alterations include intracellular signaling defects, axonal transport alterations, deregulated autophagy, alteration of synaptic function, defects in brain derived neurotrophic factor transcription, secretion and transport (3), perturbation of calcium homeostasis (6) and mitochondrial defects (7,8).

Compelling evidence supports a role of energy defects (9) and more specifically mitochondrial dysfunctions in HD pathogenesis (1,10). mHtt interacts with mitochondria, and a reduction in mitochondrial membrane potential is present in various genetic models of HD, as well as in lymphoblasts isolated from HD patients (11,12). mHtt interacts with the protein DRP1 altering transport and fusion of mitochondria (13). The biogenesis of mitochondria in HD may also be altered, especially through mechanisms involving down-regulation of PGC-1 α (14). How these anomalies progressively change the efficiency of the respiratory chain and oxidative phosphorylation is unknown. However, anomalies in the enzymes of the respiratory chain have been also reported in the striatum of HD patients. In particular, the activity of mitochondrial complex II (C-II) has been consistently found to be reduced in the striatum of HD patients (15,16). The loss of C-II activity in the striatum of HD patients is associated with a reduced expression of two subunits of C-II, the Iron-sulfur subunit (Ip, 30 kDa) and FAD subunit (Fp, 70 kDa) (17). We demonstrated a similar loss of C-II subunits and activity in striatal neurons in primary culture, following transduction with lentiviral vectors encoding the N-terminal fragment of mHtt carrying the expanded polyQ tract (17,18). Of interest, the overexpression of C-II Ip or Fp subunits has been found to be neuroprotective against mHtt toxicity in this *in vitro* model, suggesting a key role of C-II in HD pathogenesis. However, the potential mechanisms underlying the reduction in Ip expression in HD remain unknown. The defects in C-II have been rarely assessed *in vivo* in HD animal models and results are not congruent. No obvious reduction in C-II levels was observed in a knock-in mouse model of HD (19). A comprehensive review on mitochondria in HD suggested no loss of C-II activity in transgenic mouse models of HD (10). However, longitudinal proteomic analysis of R6/2 mice recently indicated that the expression of the Ip subunit significantly varies during the course of the disease, with early increases in expression (20). Thus, the potential role of C-II defects in HD remains unclear.

Here, we aimed at elucidating whether the expression of mHtt may lead to a defect in C-II *in vivo*. To address this question, we examined C-II activity and expression of subunits constituents in two mouse models of HD (N171-82Q and R6/1) (21,22) and in a rat model of HD using lentiviral vectors coding the N-terminal 171 amino acids of mHtt with 82 glutamines (lenti-171-82Q). We observed a preferential loss of C-II expression and activity in these HD models *in*

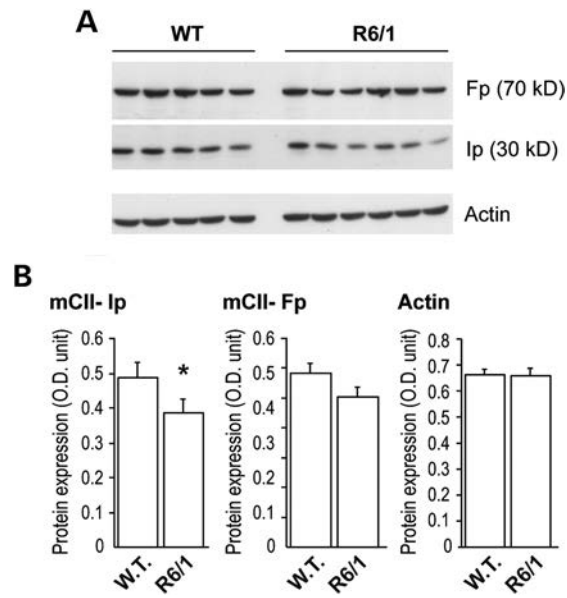


Figure 1. Change in C-II subunits in R6/1 mice. The striatum was dissected out from 16-week-old mice transgenic for human mHtt exon 1 and analyzed by western blot. Equal amount of proteins was loaded in each lane. Each lane represents a different mouse. (A) Typical western blot of samples showing the expression of Fp, Ip and actin in striatal samples. (B) Histograms corresponding to the quantification of the expression of the proteins by image analysis. Note that there is a significant loss of SDH subunit Ip, while only a trend is seen for the Fp subunit. Results are the mean \pm SEM. * $P < 0.02$, unpaired Student's *t*-test.

in vivo. We then examined whether the overexpression of C-II subunits using lentiviral vectors exerts neuroprotection against mHtt toxicity in the rat striatum.

RESULTS

Early decrease in the levels of assembled complex II in brain mitochondria in transgenic mice expressing an N-terminal fragment of mHtt

The pathogenic role of the changes in C-II expression or activity is debated and has not been systematically assessed in different genetic models of HD (see Introduction). For this reason, we analyzed C-II expression in the striatum of three different models expressing the N-terminal fragment of mHtt.

We first studied the levels of C-II subunits Ip and Fp in the striatum of the R6/1 transgenic mouse model of HD. To do this, western blot analysis was carried out on total protein homogenates. Results showed that the Ip expression levels were significantly decreased in the striatum of R6/1 mice when compared with wild-type littermates at 16 weeks of age (mean \pm SEM: wild-type, $n = 5$, 0.516 ± 0.041 OD unit; R6/1, $n = 6$, 0.387 ± 0.040 OD unit; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.05$; Fig. 1). A mild reduction in Fp levels in R6/1 was not statistically significant (wild-type, $n = 5$, 0.596 ± 0.078 OD unit; R6/1, $n = 6$, 0.503 ± 0.082 OD unit; unpaired Student's *t*-test, $P > 0.089$). Levels of actin was similar in all groups (wild-type, $n = 5$, 0.68 ± 0.016 OD unit; R6/1, $n = 6$, 0.66 ± 0.029 OD unit; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.05$). Normalization of Ip and Fp protein to actin levels confirmed selective loss of Ip subunit (Ip/actin ratio: wild-type, $n = 5$, 0.762 ± 0.061 ; R6/1, $n = 6$,

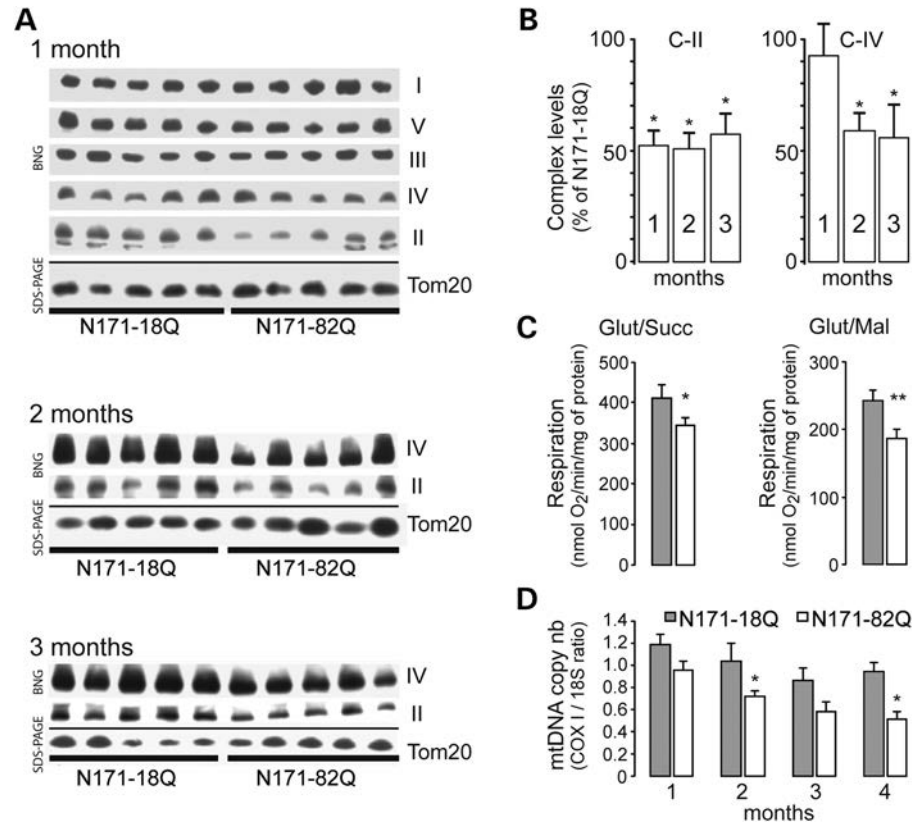


Figure 2. Mitochondrial defects in mitochondria isolated from N171-82Q transgenic mice. Mitochondria were isolated from the forebrain of N171-82Q transgenic mice and controls (N171-18Q mice) and analyzed by blue native gel (BNG) electrophoresis to detect assembled mitochondrial complexes (A and B) and evaluate respiration (C) and mtDNA copy number (D). In (A) are shown representative BN-PAGE from samples prepared with mice at different ages. Levels of Tom20 as detected using western blot were used to control for the quantity of mitochondria in each lane. Note that at 1 month, C-II levels are lower in HD transgenic mice when compared with controls, while other complexes remained essentially unchanged. (B) Quantification of complexes levels is shown. At later time points, C-IV levels are also reduced. Results are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$. (C) Respiration of mitochondria preparation was determined using either glutamate/succinate 5:2 mM (complex II) or substrates glutamate/malate 5:1 mM (complex I) at 2 and 3 months of age, respectively. Results are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.02$. (D) Evaluation of the mtDNA copy number assessed by the ratio between COX I mRNA and 18S mRNA levels measured by RT-PCR. Results are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

0.584 ± 0.044 ; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.037$; Fp/actin ratio: wild-type, $n = 5$, 0.881 ± 0.055 ; R6/1, $n = 6$, 0.768 ± 0.051 ; unpaired Student's *t*-test, n.s.; $P > 0.168$).

We next examined whether the assembly of C-II could be modified when compared with the other respiratory chain complexes. For this, mitochondria were prepared using the forebrain of N171-82Q and control mice and analyzed using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). We found that the amount of assembled C-II was significantly decreased in brain mitochondria isolated from 1-month-old N171-82Q mice, when compared with those from N171-18Q mice (Fig. 2A; mean \pm SEM: N171-82Q, $n = 5$, $51.39 \pm 7.18\%$ of N171-18Q levels; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.001$). At this early time point, the levels of the other complexes were similar in N171-82Q when compared with controls (Fig. 2). The comparison between N171-82Q and both N171-18Q littermates revealed that the defective assembly of C-II persisted at later stages of the disease, at 2 months of age (N171-82Q, $n = 5$, $50.78 \pm 8.85\%$ of N171-18Q levels; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.001$) and at 3 months of age (N171-82Q, $n = 5$, $59.43 \pm 6.8\%$ of N171-18Q levels; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.001$). The differences between N181-82Q and non-transgenic littermates became also

significant at these time points (2 months: N171-82Q, $n = 5$, mean \pm SEM: $41.6\% \pm 4.1\%$ of non-transgenic littermates levels; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.001$, not shown; 3 months: N171-82Q, $n = 4$, mean \pm SEM: $29.1 \pm 7.6\%$ of non-transgenic littermates levels; unpaired Student's *t*-test, $P = 0.0001$, not shown). C-IV assembly was also significantly defective at these later time points when N171-82Q mice were compared with N171-18Q mice (Fig. 2; N171-82Q at 2 months, $n = 5$, $58.4 \pm 6.7\%$ of N171-18Q levels, $P < 0.001$; N171-82Q at 3 months, $n = 5$, $54.9 \pm 9.9\%$ of N171-18Q levels, unpaired Student's *t*-test, $P = 0.001$). At 3 months, C-IV levels were also found to be reduced when N171-82Q mice were compared with those determined in non-transgenic mice (N171-82Q, $n = 4$, $31.8 \pm 5.4\%$ of non-transgenic littermates levels, unpaired Student's *t*-test, $P < 0.001$, not shown). Transient time point changes seen in the amount of assembled C-V and C-III were seen in the comparison between brain mitochondria isolated from N171-82Q mice and non-transgenic littermates at 1 (C-V) and 2 months (C-V and C-III) or in the comparison between brain mitochondria isolated from N171-18Q mice and non-transgenic littermates (C-V) at 1 month of age (not shown). Although defects in the functions of these two complexes have

been reported to be relevant in the pathogenesis of HD (23,24), by comparing the transgenic N171-18Q with age-matched N171-82Q, these differences were no longer visible.

Oxygen consumption was also measured on freshly isolated mitochondria of N171-82Q and control mice. Results revealed that brain mitochondria from N171-82Q mice at 2 months of age had a significant defect in the state 3 respiration using glutamate/succinate as C-II substrates (non-transgenic, $n = 6$, 412.8 ± 27.2 O₂/min/mg of protein; N171-82Q, $n = 6$, 344.3 ± 12.1 nmol O₂/min/mg of protein; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.05$; Fig. 2C). No alteration was seen in the presence of glutamate/malate as C-I substrates (not shown). At 3 months of age, mitochondria from N171-82Q showed reduced state 3 respiration using C-I substrates, when compared with N171-18Q mitochondria (Fig. 2C; N171-18Q, $n = 6$, 240.9 ± 13.5 O₂/min/mg of protein; N171-82Q, $n = 6$, 188.1 ± 12.0 nmol O₂/min/mg of protein; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.02$). Thus, early functional alterations of C-II occur in 171-82Q mice.

To determine whether any other nuclear-driven mitochondrial functions other than C-II assembly were defective in transgenic mHtt models of HD, we quantified the mtDNA copy number using cytochrome *c* oxidoreductase (COX)1 versus the nuclear 18S gene amplification rate using quantitative real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). This assay requires only a little amount of tissue, and it was therefore possible to perform it on total DNA isolated selectively from striata of N171-82Q and N171-18Q mice, at different stages (Fig. 1D). A progressive decline in the amount of mtDNA was found in the striatum of N171-82Q mice when compared with N171-18Q. This difference was observed in the animals at pre-symptomatic ages (1 month) and became bigger thereafter. Statistical analysis showed that the reduction was linked to genotype and aggravated with age ($n = 5-11$; two-way ANOVA; gene, $F = 52.98$, $P < 0.005$; age, $F = 14.71$, $P < 0.027$) and differences were significant at 2 and 4 months of age ($P < 0.05$ and $P < 0.004$, respectively, using pairwise multiple comparison procedure with the Holm–Sidak method). This observation indicated reduced mitochondrial biogenesis in N171-82Q mice.

Reduced striatal levels of complex II in a rat model expressing a short N-terminal fragment of mHtt

We studied whether the expression of mHtt could produce changes in C-II expression or activity in a rat model of HD (25). In this rat model, intrastriatal injection of lentiviral vectors coding mHtt are used, leading to a first phase of mild neuronal dysfunction (2–8 weeks) followed by a phase of actual degeneration (10–12 weeks) (26–28). The severity of the lesions produced by lentiviral vectors encoding mHtt can be assessed using biochemical markers of neuronal integrity such as DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32 kDa), COX and NeuN (neuronal nuclei marker, i.e. Fox-3). The series of experiments performed in the rat model is presented in Figure 3.

We assessed the effect of mHtt on C-II activity using *in situ* succinate dehydrogenase (SDH) histochemistry and image

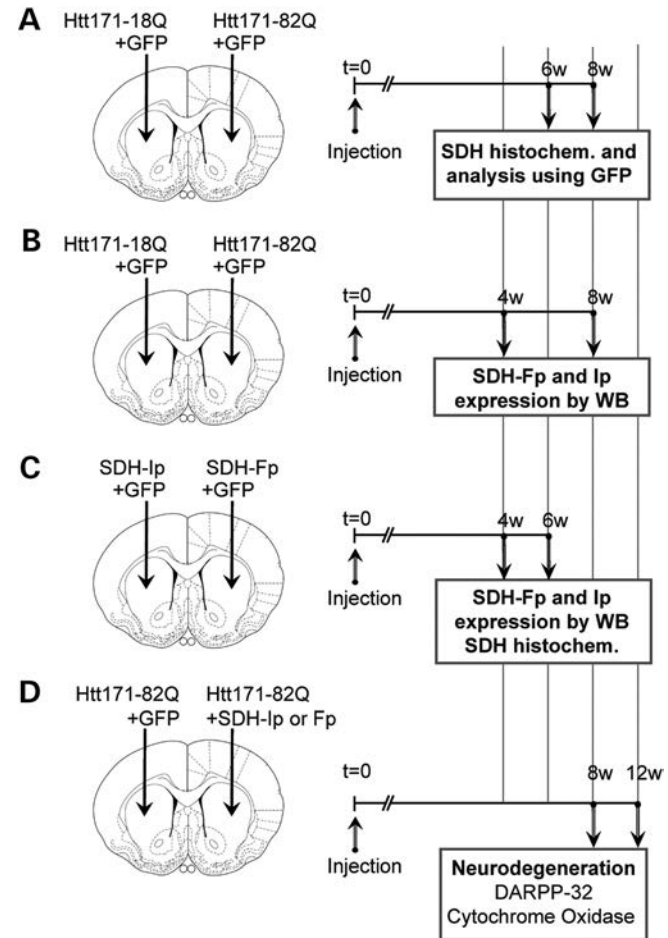


Figure 3. Experimental design to study mitochondrial complex II expression change induced by mHtt in rats. In all experiments, adult rats received a stereotaxic injection of lentiviral vectors (4 μ l). Animals were infected with a lentiviral vector encoding the 171 N-terminal amino acids of mHtt with 82 polyQ repeats (Htt171-82Q), or the corresponding wild-type fragment with 18 polyQ repeats (Htt171-18Q) with the reporter fluorescent protein green fluorescent protein (GFP) or vectors coding the C-II Fp or Ip subunit. In the first experiment (A), rats were injected with lentiviral vectors (4 μ l) encoding GFP (left and right striatum, 100 ng/ μ l of p24) plus either Htt-171-82Q (right striatum, 150 ng/ μ l of p24) or Htt-171-18Q (left striatum, 150 ng/ μ l of p24). Semi-quantitative evaluation of C-II activity using histochemistry of SDH activity was performed at 6 weeks to analyze the co-localization of SDH activity with GFP and the 3D measurement of SDH activity in the area showing SDH depletion. In the second experiment (B), rats were injected with lentiviral vectors (4 μ l) encoding GFP (left and right striatum, 100 ng/ μ l of p24) plus either Htt-171-82Q (right striatum, 150 ng/ μ l of p24) or Htt-171-18Q (left striatum, 150 ng/ μ l of p24). Rats were killed at 6 weeks post-surgery. Striatal punches of the fluorescent area were made to prepare tissue homogenate to perform western blot analysis of Fp, Ip and actin expression. In the third experiment (C), rats were injected with lentiviral vectors (4 μ l) encoding GFP (left and right striatum, 100 ng/ μ l of p24) plus either lenti-Fp (right striatum, 150 ng/ μ l of p24) or lenti-IP (left striatum, 150 ng/ μ l of p24). Rats were killed at 4 weeks post-surgery. Striatal punches were made to prepare tissue homogenate to perform western blot analysis of C-II subunits Fp and Ip and Tom20. In addition, rats were also injected to perform SDH histochemistry. In the fourth experiment (D), rats were co-injected with lentiviral vectors (4 μ l) encoding wt-Htt171-18Q fragment or mHtt171-82Q fragment (100 ng/ μ l of p24) plus either Fp (150 ng/ μ l of p24), Ip (150 ng/ μ l of p24) or GFP as a control of viral load. Rats were killed at 12 weeks post-surgery and processed for the evaluation of striatal degeneration using DARPP-32 immunohistochemistry and COX histochemistry.

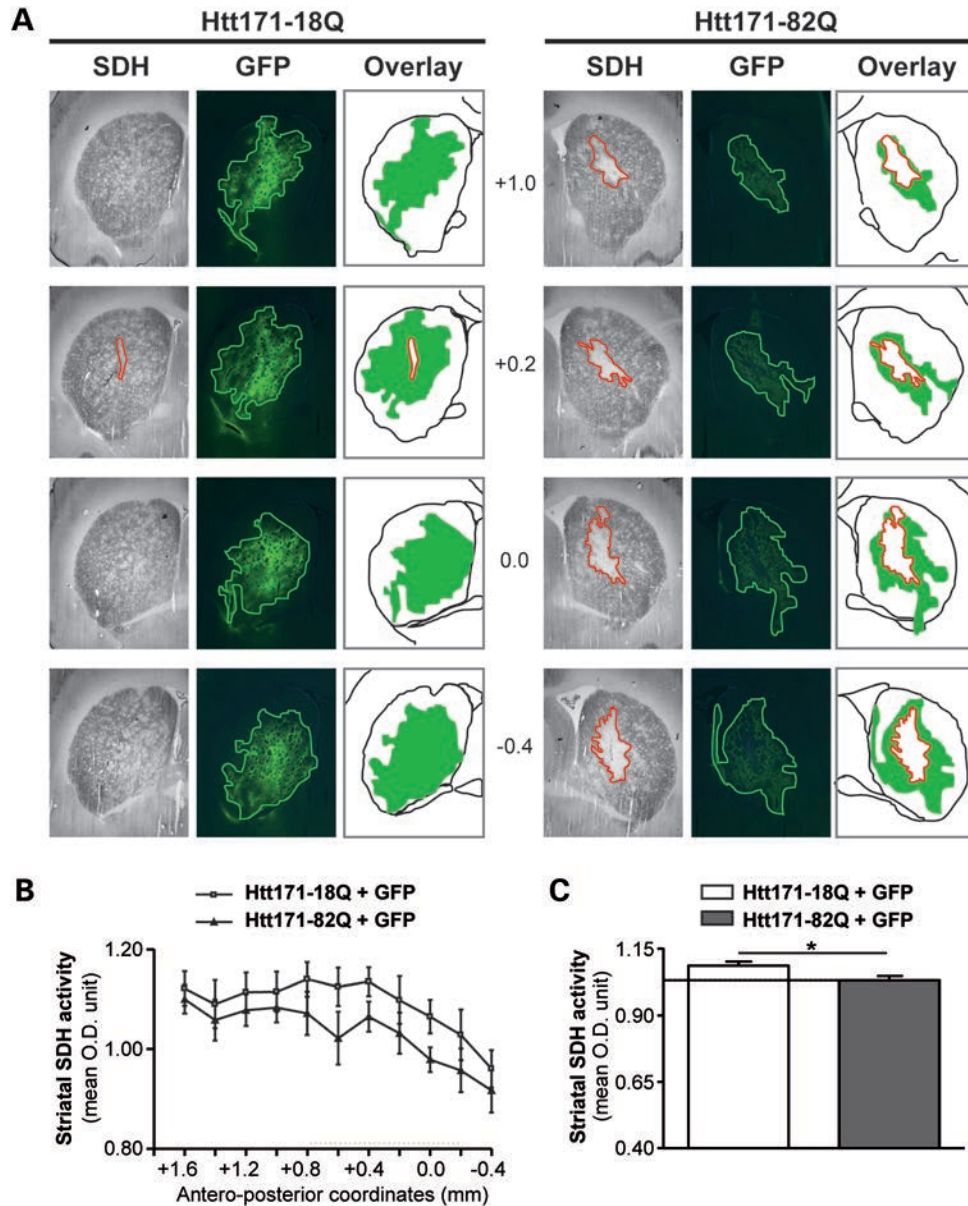


Figure 4. Lentiviral vectors expressing mHtt fragment leads to a loco-regional reduction in SDH activity *in vivo*. Animals were infected with a mixture of lentiviral vector encoding the reporter fluorescent protein GFP mixed with vectors coding Htt171-18Q (left panel) or mHtt171-82Q (right panel). **(A)** Bright field (SDH histochemistry) or fluorescence images were taken from representative coronal brain sections at the levels of the striatum at 6 weeks post-infection. Red lines delineate areas of SDH activity loss. Overlay show the area of SDH loss (red) superimposed to area where the transgenes are expressed (green). Note minimal loss of SDH activity in the control group, in contrast to the striatum injected with lenti-Htt171-82Q. Note that the zone presenting the loss of SDH activity is within the area expressing mHtt. **(B)** Analysis of the total SDH activity in the striatum along the rostrocaudal. **(C)** Histograms corresponding to the total SDH activity measured in the striatum in both groups. Scale bar, 1 mm. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.002$, $n = 6$ per group, two-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni/Dunn test.

analysis. We found in a first series of experiments that SDH activity was clearly reduced in the striatum of rats at 8 weeks after infection with lenti-Htt171-82Q. To more precisely characterize this phenomenon of SDH loss and determine whether it could occur earlier in our model, we co-infected the striatum with a mixture of lenti-Htt171-82Q plus lenti-green fluorescent protein (GFP) or a mixture of lenti-Htt171-18Q plus lenti-GFP and examined the animals at 6 weeks post-infection. The injection of lentiviral vectors coding for GFP allowed us to precisely delineate the area that was infected using fluorescence detection [i.e. expressing mHtt or wild-type Htt (wt-Htt)] on frozen

sections (Fig. 4). Thus, we could determine whether the area presenting a reduction in C-II activity as seen using SDH histochemistry could be superimposed on that expressing mHtt and GFP. Microscopy observation indeed indicated that the area of SDH loss co-localized within the area of GFP as seen on adjacent sections when lenti-Htt171-82Q was co-injected (Fig. 4). In contrast, when lenti-Htt171-18Q was co-injected with lenti-GFP, there was no loss of SDH activity (Fig. 4). We performed semi-quantitative analysis of the average SDH activity of the striatum along its rostro-caudal extension after infection with lenti-Htt171-82Q in comparison with SDH activity measured

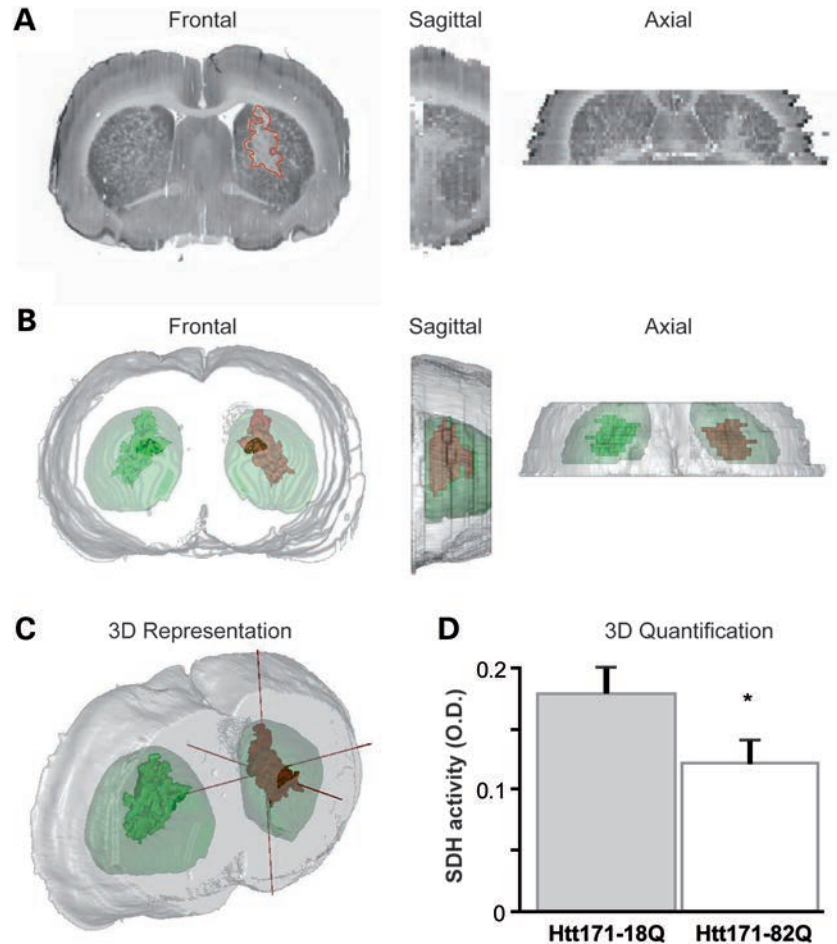


Figure 5. Estimation of the loss of SDH activity in the area expressing mHtt in the lentiviral rat model. (A) Bright field (SDH histochemistry) or fluorescence images were taken from representative coronal brain sections at the levels of the striatum at 6 weeks post-infection and stacked for 3D reconstruction. (B and C) 3D reconstruction of the brain anatomy (gray) with super-imposition of the volume presenting a loss of C-II activity (red) in the striatum infected with lenti-Htt171-82Q (mHtt) and its symmetrical projection in the striatum with wt-Htt (green). (D) Histograms corresponding to the regional SDH activity measured in the striatum expressing Htt171-82Q and symmetrically in the contra-lateral striatum. Scale bar, 1 mm. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.01$, $n = 6$ per group, paired Student's t -test.

in the contralateral striatal area infected with lenti-Htt171-18Q. Analysis showed that the loss produced by Htt171-82Q was highly significant (two-way ANOVA; Htt171-82Q effect, $F = 4.82$, $P < 0.03$; Antero-posterior levels, $F = 9.12$, $P < 0.003$, and *post hoc* Bonferroni/Dunn test, $P < 0.0017$), although of minimal amplitude ($\sim 10\%$), since the volume of infection was small compared with the entire striatum (Fig. 4). In order to better characterize the loss of SDH activity, tridimensional (3D) reconstruction was performed to measure SDH activity in the area of depletion in the striatum infected with lenti-Htt171-82Q and automatically compared with the activity in the contralateral striatum injected with lenti-Htt171-18Q as a control. A statistically significant $\sim 30\%$ loss of SDH activity was found (group, n , mean \pm SEM; lenti-Htt171-18Q, $n = 6$, 0.180 ± 0.007 OD unit; lenti-Htt171-82Q, $n = 6$, 0.125 ± 0.006 OD unit; $P < 0.01$, paired Student's t -test). Thus, the expression of mHtt produces a severe loss of C-II activity *in vivo* (Fig. 5).

We next took advantage of the ability to detect GFP on fresh tissue to prepare tissue extracts containing mostly striatal

neurons expressing Htt171-82Q or Htt171-18Q after infections. Small punches were made in the GFP-positive area on fresh slices and processed for western blot analysis. We assessed the level of expression of the C-II subunit, Ip and Fp at 6 weeks post-infection using western blot analysis (Fig. 6). Extracts from striata infected with lenti-Htt171-82Q displayed similar actin levels when compared with lenti-Htt171-18Q (group, n , mean \pm SEM; lenti-171Htt-18Q, $n = 6$, 2.52 ± 0.27 OD unit; lenti-Htt171-82Q, $n = 6$, 2.79 ± 0.37 OD unit; unpaired Student's t -test, $P > 0.58$), consistent with equal protein loading and the absence of major neurotoxic effects of mHtt at these early time points after infection. The levels of the Core2 subunit of complex III showed no change between groups, indicating that mitochondria density was not markedly changed in the HD context (not shown). The expression of the Ip protein, however, was significantly reduced at 6 weeks post-infection in the samples expressing Htt171-82Q (Ip/actin ratio; lenti-Htt171-18Q, $n = 6$, 0.275 ± 0.037 ; lenti-Htt171-82Q, $n = 6$, 0.142 ± 0.033 ; unpaired Student's t -test, $P < 0.02$). The expression of the Fp subunit showed a trend to decrease that did not reach significance

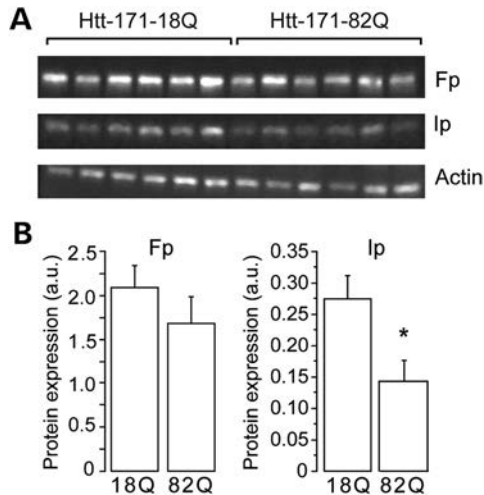


Figure 6. Loss of C-II subunits produced by mHtt in the rat lentiviral model. Rats were infected with a mixture of lentiviral vector encoding the reporter fluorescent protein GFP mixed with vectors coding either Htt171-18Q (left panel) or mHtt171-82Q (right panel). Small striatal samples expressing mHtt or wt-Htt were dissected out at 6 weeks and analyzed by western blotting. Equal amount of proteins was loaded in each lane. Each lane represents a different rat. (A) A typical western blot of samples obtained at 6 weeks post-infection showing expression of Fp, Ip and actin in striatal samples. (B) Histograms corresponding to the quantification of the expression of the proteins by image analysis. Note that there is a significant loss of SDH subunit Ip, while only a trend is seen for the Fp subunit. Results are the mean \pm SEM. * $P < 0.02$, $n = 6$ per group, unpaired Student's *t*-test.

(Fig. 6; Ip/actin ratio: lenti-Htt171-18Q, $n = 6$, 2.091 ± 0.252 ; lenti-Htt171-82Q, $n = 6$, 1.685 ± 0.304 ; unpaired Student's *t*-test, $P < 0.02$).

Overexpression of Ip and Fp C-II subunits is neuroprotective against mHtt *in vivo*

To test whether the loss of C-II subunits might play a causal role in mHtt toxicity *in vivo*, we examined whether the overexpression of subunits could be neuroprotective. We attempted to overexpress the subunits of C-II *in vivo* using lentiviral vectors as we previously did in cell cultures (17,18). The lentiviral constructs coding for C-II Ip and Fp were similar to those used for *in vitro* experiments but were prepared at higher titres for *in vivo* infections. Batches of lenti-Fp and lenti-Ip vectors were first re-tested in primary cultures of striatal neurons to show that they indeed induced an increased expression of Fp and Ip proteins (not shown). For the *in vivo* experiments, the same batches of vectors coding C-II subunits were mixed with lenti-GFP and injected into the striatum. Four weeks later, striatal punches were made in the GFP-positive area and analyzed by western blotting. Results showed that levels of the Fp subunit were significantly increased in the area infected with lenti-Fp (Fig. 7A). Ip levels in the striatum infected with lenti-Fp were not modified. After the infection with lenti-Ip, the levels of the Ip subunit were increased, while the Fp levels remained unchanged (Fig. 7B). Using the same experimental paradigm, we tested histoenzymatically on frozen sections from other infected animals, if the activity of C-II was increased in the striatal area where the lenti-Fp or lenti-Ip was injected. Results showed that Fp or Ip overexpression produced no major increase in

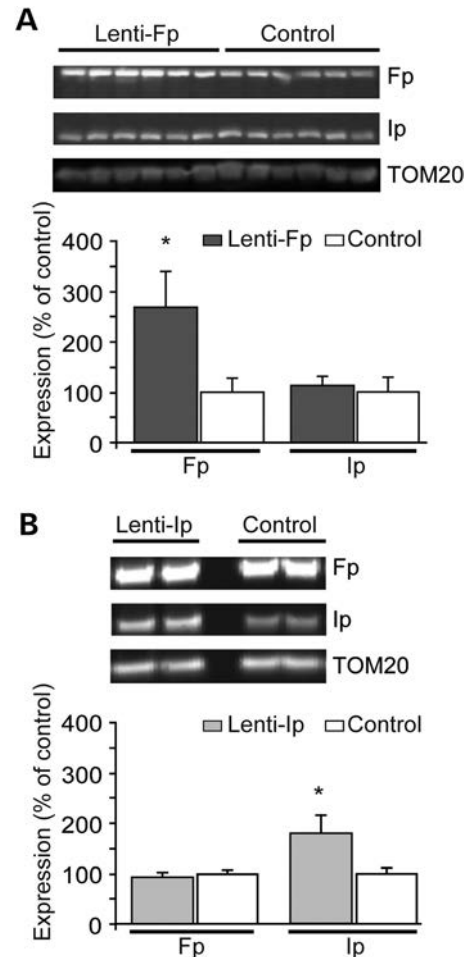


Figure 7. Study of the transduction efficacy of lentiviral vectors coding C-II Ip and Fp subunits *in vivo*. Rats received intrastriatal injection of lenti-Fp (A) and lenti-Ip (B) mixed with lenti-GFP and the infected area was dissected out 4 weeks later using fluorescence detection for western blot analysis. Representative western blots are shown in upper panel. Control rats have been injected with lentiviral vectors coding the reporter gene LacZ. Results are the mean \pm SEM. * $P < 0.01$, $n = 4-6$ per group, unpaired Student's *t*-test.

SDH activity (group, n , mean \pm SEM; lenti-Fp: $n = 3$, 0.798 ± 0.051 OD unit; lenti-Ip, $n = 3$, 0.754 ± 0.021 OD unit; lenti-LacZ (control), $n = 4$, 0.782 ± 0.009 OD unit; one way ANOVA, n.s., $P > 0.6$) (Supplementary Material, Fig. S1).

We next examined the potential neuroprotective effects of lenti-Fp or lenti-Ip against lenti-Htt171-82Q toxicity. In these neuroprotection experiments, lenti-GFP was used as a control of viral load for infection. After 12 weeks, as expected based on previous works (25–28), infection of the striatum with lenti-Htt171-82Q produced local degeneration characterized by loss of DARPP-32 immunohistochemical labeling and COX histochemical labeling (Fig. 8). In the case of the infection with lenti-Htt171-18Q, no major lesion was observed except for the small mechanical trauma produced by the needle during the stereotaxic injection of viral suspensions. The volume of the loss of DARPP-32 and COX produced by lenti-Htt171-18Q was minimal (mean \pm SEM; $n = 10$; DARPP-32: 0.075 ± 0.013 mm³; COX: 0.054 ± 0.019 mm³). Infection with lenti-Htt171-82Q mixed with lenti-GFP produced much larger lesions readily detected under

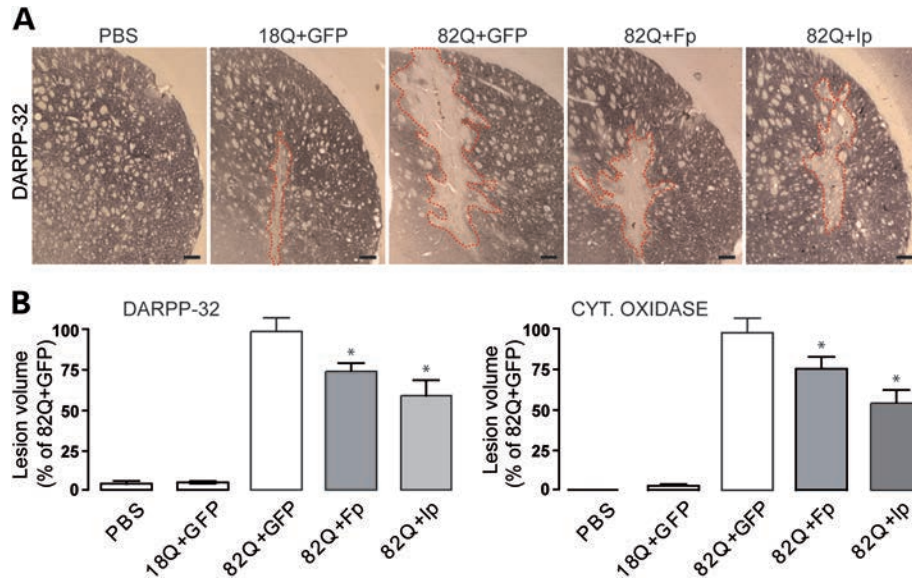


Figure 8. Neuroprotective efficacy of Fp and Ip against mHtt neurotoxicity *in vivo*. Rats were co-injected with lentiviral vectors encoding wt-Htt171-18Q fragment or mHtt171-82Q plus either, Fp, Ip or GFP as a control of viral load. Rats were killed at 12 weeks post-surgery and processed for histological evaluation. (A) Photomicrographs of representative lesions seen in the different groups of rats to characterize striatal degeneration using DARPP-32 immunohistochemistry. Scale bar, 200 μ m. Histograms in (B) represent the volume of lesions produced in the different conditions when assessed by the Cavalieri method using DARPP32 immunohistochemistry (left) and cytochrome *c* oxidase (Cyt. Oxidase) histochemistry (right). Note that the volume of striatal lesions produced by mHtt is significantly reduced by overexpressing Fp and Ip proteins when compared with control (GFP). Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.01$, $n = 10$ –12 per group, one-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test.

microscope observation ($n = 9$; DARPP-32: $1.550 \pm 0.115 \text{ mm}^3$; COX: $1.855 \pm 0.132 \text{ mm}^3$). Co-infection with lenti-Htt171-82Q mixed with lenti-Fp produced a partial ($\sim 30\%$) but significant reduction in the volume of striatal lesions produced by lenti-Htt171-82Q plus lenti-GFP as seen using DARPP-32 and COX staining (Fig. 8) ($n = 10$; DARPP-32: $1.159 \pm 0.080 \text{ mm}^3$; COX: $1.433 \pm 0.137 \text{ mm}^3$; $P < 0.002$ and $P < 0.02$, respectively, when compared with lenti-Htt171-82Q+lenti-GFP, ANOVA and the *post hoc* Bonferroni test). Co-infection with lenti-*Ip* produced a stronger ($\sim 50\%$) reduction in the mHtt-induced lesion compared with control (Fig. 8) ($n = 12$; DARPP-32: $0.917 \pm 0.145 \text{ mm}^3$; COX: $1.008 \pm 0.144 \text{ mm}^3$; $P < 0.005$ and $P < 0.004$, respectively, when compared with lenti-Htt171-82Q+lenti-GFP, ANOVA and the *post hoc* Bonferroni test). Thus, the overexpression of Fp and Ip is neuroprotective against mHtt toxicity.

We also examined whether the overexpression of the *Ip* subunit could have an effect on mHtt-containing aggregates. The number and the size of aggregates detected by EM48 immunohistochemistry in rats infected with lenti-Htt171-82Q were not significantly different between rats co-infected with lenti-*Ip* and animals infected with lenti-GFP. This indicated no major effect of *Ip* overexpression on mHtt aggregation (Supplementary Material, Fig. S2).

DISCUSSION

The present study shows that the assembly of C-II in the mitochondria is defective in the N171-82Q transgenic mouse model of HD expressing the N-terminal part of mHtt. This is accompanied by a reduction in mitochondrial biogenesis.

Decreased assembly of C-II corresponds to a reduced activity, as seen by oxygen consumption assays. We also show that the expression on the *Ip* subunit of C-II is significantly decreased in two different genetic models expressing short N-terminal fragments of mHtt. Moreover, we show that the overexpression of the C-II subunit Fp protein and, more efficiently, the *Ip* protein can prevent mHtt-induced degeneration of striatal neurons *in vivo*.

The N171-82Q mouse models we examined indicated that the assembly of C-II was defective at relatively early stage of the disease. Indeed, loss of C-II assembly was observed at 1 month of age in these HD mice expressing an expanded polyQ tract when compared with transgenic mice expressing the wild-type fragment with 18 glutamines. At this early time point, the expression of the other mitochondrial complexes appears unchanged when compared with controls. Later, BN-PAGE analysis showed that the C-II levels were persistently low and that the C-IV levels in the respiratory chain were also found to be reduced. The results obtained by BN-PAGE functionally corresponded to the results obtained by the classic respirometry assays. Reduced assembly of C-II in N171-82Q mice is followed by a reduction in the activity of the complex. Indeed, oxidative phosphorylation/ O_2 consumption evaluated using succinate as a substrate was significantly decreased in N171-82Q mice. Consistent with C-II defects, we found that the total levels of the *Ip* protein are reduced in the striatum of a different mouse model, the R6/1 line at 16 weeks of age, an early stage in these mice that die around 30–35 weeks (29). Western blot analyses showed that the loss of *Ip* is relatively selective, since the levels of the Fp subunit are not significantly reduced in this mouse model. A loss of C-II activity along with a preferential reduction in *Ip* subunit levels were also found 6 and 8 weeks after intrastriatal infection in the lentiviral model of HD in rats. This

loss was circumscribed to the striatal region expressing the mHtt fragment. All these observations are congruent with our previous findings in primary cultures of striatal neurons expressing mHtt, where loss of Ip preceded that of Fp (17), and was seen while many other mitochondrial proteins showed no major expression changes. Thus, the present observations are compatible with the possibility that the relatively selective reduction in the expression and incorporation of the Ip protein in the C-II at the level of the respiratory chain could lead to a general reduction in the assembly and/or the stability of C-II and partial loss of its activity. Other studies reported preferential defects in C-II in Yeast (23) and mammalian cell models expressing mHtt exon 1 (30). Interestingly, transient changes in Ip subunit expression in R6/2 mice have been described using a careful large scale proteomic analysis of the forebrain, with very early reduction in the expression at 2 and 8 weeks of age (20). Such changes were not seen in other studies in R6/2 mice, while C-II activity tended to increase at early stage of the disease in YAC72 mice (31).

The defects in C-II have been consistently observed in the striatum of HD patients. Enzymatic activity of C-II was preferentially reduced in the striatum of symptomatic patients, while the cerebral cortex showed no significant modifications (15,16,32–36). Indications of C-II defects were also reported in muscle from HD patients (37). The expression of the Ip protein is markedly reduced in the caudate and putamen of symptomatic HD patients, while the expression of many other mitochondrial proteins remains essentially normal (17). Importantly, the loss of the Ip protein was found to occur preferentially in the striatum, while no significant reduction in expression could be observed in the cerebral cortex and cerebellum of HD patients. A similar regional analysis of the C-II assembly using BN-PAGE could not be carried out in N171-82Q mice, since the method requires too much material for mitochondria preparation. However, the present western blot analysis of the striatum of R6/1 mice showed a significant reduction in the total levels of Ip (assembled and not assembled). Thus, it is possible that the loss of the C-II assembly and activity and a reduction in Ip expression are phenomena that preferentially affect the striatum.

The relationship between the different changes we observed (Ip loss, C-II assembly defects, reduced C-II activity) is not yet totally elucidated in terms of causality. The elucidation of the mechanisms that could mediate the down-regulation of Ip awaits further studies. A few working hypotheses have been already discussed previously (17). The present observations suggest that it may be a consequence of defective assembly mechanisms leading to an increase in the rate of degradation of the protein.

The defects in C-II may result from a mHtt-induced dysfunction of mitochondria. In the present study, we observed a reduction in mitochondrial biogenesis in N171-82Q mice. This is consistent with the functional alteration of the PGC-1 α pathway in HD (14). PGC-1 α is a co-activator of transcription that plays a key role in stimulating mitochondrial biogenesis through its action on the transcription factors NRF-1 and NRF-2 (38,39). NRF-1 activates the transcription of mitochondrial genes, such as COX1 and cytochrome *c*. A well-documented study showed that the promoter of the SDH-B gene encoding for the Ip subunit has functional sites that bind NRF-1 and NRF-2 in the proximity of the initiation site (40).

However, the hypothesis that the loss of PGC-1 α is directly responsible for the loss of C-II is not compatible with the observation that levels of mRNA coding SDH-*Ip* or SDH-*Fp* are not changed in HD patients and models. Our *in vitro* study on striatal neurons showed unchanged levels of the SDH-*Ip* mRNA, while levels of the Ip protein were down regulated (17). In line with this, SDH-*Ip* (and SDH-*Fp*) mRNA levels are not markedly reduced in HD patients and mouse models as assessed by gene arrays studies (41,42), while enzymatic C-II activity and Ip levels are down regulated. Similarly, whereas SDH-*Ip* mRNA expression is not changed in R6/2 mice, levels of the protein vary depending on the age of the mice (20). Thus, Ip regulation likely occurs at a post-transcriptional level.

One possible post-transcriptional regulatory mechanism of Ip expression may be linked to the well-documented alterations of mitochondrial membrane potential in HD (1). This could disturb the import of C-II constituents, since the machinery of protein import uses mitochondrial membrane potential (43).

The defects in the C-II assembly may also result from the alteration of specific molecular factors for import/assembly of Ip into the complex. Destabilization of the C-II assembly may more profoundly alter the levels of Ip when compared with the other subunits of the complex. The proteins involved in the import of Ip and more generally C-II subunits have not been identified in mammals. The protein coded by TCMP62 in Yeast likely codes a chaperone-like protein involved in the C-II assembly (44,45). It is a membrane protein that interacts with SDHA and SDHB gene products. Knockdown of TCMP62 leads to the loss of the C-II assembly. There is no known homolog in mammals. SDH Assembly Factor 1 (SDHAF1) has been recently found to be key SDH assembly factor (46). Other few proteins have been identified to interact with Ip and Fp proteins, including human Frataxin and its Yeast ortholog Yfh1p (47) and the protein CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcripts) which is neuroprotective in cell models of ischemia/hypoxia (48).

Post-transcriptional modification of the C-II subunit may also regulate the C-II assembly. The C-II/SDH subunit Fp has been shown to be regulated by acetylation. Recent experiments showed that Fp is hyperacetylated in SIRT3 knockout mice and SIRT3 directly deacetylates Fp in a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent manner (49,50). Fu and collaborators demonstrated that mHtt leads to a decrease in SIRT3 activity (51). This may be a consequence of both reduced PGC-1 α as well as reduced NAD concentrations. Thus, loss of SIRT3 in the HD context may lead to hyperacetylation of Fp, reducing the assembly of Fp in C-II, perturbing the turnover of Ip and eventually decreasing the enzymatic activity of C-II. A loss of SIRT3 has been implicated in other neurodegenerative diseases including Friedreich ataxia (52).

One important finding in the present study is that the overexpression of the SDH Ip subunit, and to a lesser extent, SDH Fp exerts significant neuroprotective effects against mHtt *in vivo*. This indicates, as suggested by our previous *in vitro* experiments, that loss of Ip in HD models may contribute to neurodegeneration. This protective effect may appear at first surprising, since loss of Ip is likely not an early event in the molecular cascade triggered by mHtt to kill neurons. Especially, the reduced expression of PGC-1 α , mitochondrial biogenesis, altered mitochondrial membrane potential, abnormal fragmentation and cristae disorganization are likely preceding C-II loss and reduction in Ip

levels. However, neurodegeneration signaling might be seen as a non-linear phenomenon rather resembling to a vicious cycle. Overexpression of Ip (and similarly Fp) likely produces a stabilization of C-II levels which may have important consequences to maintain energy production in the tricarboxylic acid (TCA) cycle and electron flow in the respiratory chain. Ip may also contribute to control reactive oxygen species (ROS) production as suggested by others, since the Ip protein is considered to be a potential 'sensor' of the ubiquinone pool in the mitochondria (53). Although C-II is debated as a source of ROS by itself, compelling evidence showed that disturbing C-II function at least indirectly produces the elevation of ROS levels, and increased ROS production is a well-documented feature of both HD transgenic mice and HD patients (54). Thus, the overexpression of Ip and the improved stabilization of C-II may be sufficient to delay striatal neuron demise. Our data suggest that while important contributors of mHtt-induced energy perturbation (e.g. perturbation of PGC-1 α) are upstream of the deregulation of C-II by mHtt, the consequent loss of the Ip protein is a key event contributing to the expression of neurodegeneration and that correcting this anomaly retards the death/dysfunction of striatal neurons.

The lentiviral gene transfer approach for the overexpressing Ip protein should be so far considered as only a proof of principle that *in vivo*, C-II may be an interesting therapeutic target for slowing degeneration in HD. It would be of prime interest to find small molecules that could increase Ip expression and C-II stabilization or anaplerotic chemicals that bypass C-II defects or improve TCA cycle and respiratory chain efficiency. Other potential approaches would be to utilize agents which increase the expression of PGC-1 α (e.g. bezafibrate) or which improve mitochondrial function as recently shown using the mitochondrial anti-oxidant XJB-5-131 (55,56). The results provide further evidence that targeting mitochondrial dysfunction in HD may be a useful therapeutic strategy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Rats

Four-month-old male Sprague-Dawley rats (Charles River) were used. The animals were housed in a temperature-controlled room maintained on a 12 h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Experiments were performed in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC for the care and use of laboratory animals or were approved by the Animal Care and Use Committee of the Weill Medical College of Cornell University.

Transgenic mice

Transgenic mice expressing the wt-Htt (N171-18Q) and mHtt (N171-82Q) N-terminal fragment of the human Htt (22), as well as non-transgenic littermates were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred at the Weill Medical College of Cornell University animal facility. Both male and female mice expressing wt-Htt or mHtt were studied at various disease stages and compared with non-transgenic age- and gender-matched littermates. In most experiments, a similar number of male and female pairs were used. In these mice, the symptomatic stage is characterized by

incoordination, ataxia and weight loss with onset at \sim 3 months of age. Mice die prematurely at \sim 6 months of age. Male R6/1 transgenic mice expressing exon-1 of human mHtt were obtained from Jackson Laboratory. Mice were genotyped by PCR as described previously (21). Animals were bred at the animal facility of the University of Barcelona. R6/1 mice were used when they started to have motor coordination impairment at 16 weeks of age (29).

Isolation of brain mitochondria

Non-synaptic brain mitochondria were isolated by a PercollTM gradient purification method as described previously (57). All procedures were conducted at 4°C. Mice were sacrificed by decapitation and the forebrain was excised and homogenized in a mannitol-sucrose isolation medium (225 mM mannitol, 75 mM ultrapure sucrose, 5 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4) containing 0.1 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) and 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA). Homogenates were centrifuged for 6 min at 2400g in a Beckmann L8-80 ultracentrifuge using a 50 TI rotor. The supernatant was collected and centrifuged for 14 min at 13 000g. The resulting pellet was resuspended in isolation medium containing 15% PercollTM and 1 mM EGTA and layered on the top of a discontinuous PercollTM gradient (23/40%). The gradient was centrifuged for 14 min at 38 000g, and the 23/40 inter-phase layer, containing the mitochondria, was collected. Mitochondria were washed three times with isolation medium without BSA and centrifuged for 14 min at 13 000g. The pellet containing purified mitochondria was resuspended in 100 μ l of isolation buffer without EGTA and BSA (58). Mitochondrial protein concentration was measured with a protein assay kit (BioRad, Hercules, CA, USA), using BSA as a standard.

Blue native PAGE

We have investigated by blue native gel electrophoresis the molecular organization of the mitochondrial respiratory chain.

BN-PAGE is a high-resolution electrophoretic technique used for the isolation of membrane bound proteins (59). The solubilization of biological membranes in cellular or mitochondrial preparations is obtained by applying mild detergents. Upon the addition of the coomassie dye (Coomassie blue G-250) protein aggregation is reduced, all the membrane proteins, and also many water soluble, acquire a negative charge which pulls to the anode during electrophoresis, irrespectively of their isoelectric point.

Fifty micrograms of the brain mitochondrial preparation were resuspended in 50 μ l of a BN mitochondria buffer (1.5 M aminocaproic acid, 50 mM bis-tris, pH 7.0, at 4°C) and then treated with 2 μ l of *N*-dodecylmaltoside (DDM; 10% w/v) on ice for 5'. Finally, samples were centrifuged for 30 min at 20 000g. The supernatants were transferred to clean tubes and 5 μ l of a BN sample buffer (Coomassie Blue G-250 5% w/v suspension in 750 mM 6-aminohexanoic acid, 50 mM bis-tris, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 7.0, at 4°C) was added to the samples for BN-PAGE. Gels were cast as described for BN-PAGE (60,61). We used 5–13% acrylamide gradient gels with 4% sample gels on the top to separate DDM-solubilized individual mitochondrial complexes. Gels were run in a vertical

electrophoresis apparatus under the conditions described for BN-PAGE (61). Transfer of proteins onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham Biosciences) was carried out overnight at 30 V at 4°C. For immunodetection of protein complexes, monoclonal antibodies (Molecular Probes) against the following subunits were used: 39 kDa of complex I, 70 kDa of complex II, core 2 of complex III, subunit I of complex IV and subunit β of complex V. Native high molecular weight markers were from Amersham Biosciences (59). For protein loading control, the 10 μ l of the DDM-treated mitochondrial preparation was mixed to an equal amount of Laemmli sample buffer and loaded in an SDS-PAGE. Transfer onto a PVDF membrane was carried out as described above. Outer (TOM20) or inner (TIM 23) membrane markers were immunodetected with a specific antibody (Santa Cruz). When the antibody against the 70 kDa (Fp) subunit was used, a reserve pool of the not assembled 70 kDa subunit was immunodetected as a second and lower molecular weight band in addition to the fully assembled C-II band, normally detected around 130 kDa. Depending on the daily hand-cast gradient gel preparation and the bands migration, this protein would go undetected when co-migrating with the Brilliant blue G in the dye front. Brain mitochondria isolated from five animals of each genotype and age group were compared as shown.

Oxygen consumption

The rate of O₂ consumption was measured in brain mitochondria using a Clark oxygen electrode in a waterjacketed cell, magnetically stirred at 37°C (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) as previously described (62,63). Briefly 10 μ l of freshly isolated brain mitochondria was resuspended in a respiration medium (125 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). State 3 respiration was recorded in the presence of 0.4 mM adenosine di-phosphate. The state 3 rates were recorded in the presence of glutamate:malate 5:1 mM or glutamate:succinate 5:2 mM. State 4' was induced with the specific inhibitor of the Adenine Nucleotide Translocator, carboxy Atractilate. The protein content in all samples was measured with a protein assay kit (BioRad), using BSA as a standard. For oxygen consumption, the comparison between wild-type and Tg was done day by day to minimize variability due to isolation. Brain mitochondria isolated from six animals of each genotype and age group were compared.

Quantitative real-time PCR

For the quantification of the relative amount of mitochondrial DNA (mtDNA), total DNA was isolated from liquid nitrogen frozen striatal sections of transgenic (N171-18Q and N171-82Q), as well as non-transgenic mice, as described (64). The mtDNA copy number was determined by qRT-PCR using SYBR Green Chemistry on a Roche Light Cycler (Roche, USA). The abundance of the mtDNA-encoded template [from nucleotide (nt) 6409 to nt 6636] in the COX1 gene sequence was assayed (primers: forward CAT CCC TTG ACA TCG TG, reverse CTG AGT AGC GTC GTG G) and normalized using a nuclear-encoded template for the 18S gene (primers: forward CGGACAGGATTGACAGA, reverse: CCAAGT-CAGTGTAGCGC) (65). Each reaction was optimized and

confirmed over an appropriate linear concentration range using genomic DNA standards. Samples were analyzed in duplicate for both assays, enabling the calculation of the average mtDNA:nuclear DNA ratio. The numbers of samples for these experiments were as follows: for N171-82Q, $n = 7$ at 1 and 2 months, $n = 5$ at 3 months and $n = 6$ at 4 months; for N171-18Q: $n = 6$ at 1 and 2 months of age and $n = 11$ at 3 and 4 months of age.

Lentiviral vector production and intrastriatal injection

Vector production

The construction of SIN-W-PGK (mouse phosphoglycerate kinase 1) vectors encoding Htt171-18Q and Htt171-82Q has been described previously (26), as has the GFP construct (66). Construct for overexpressing Fp and Ip proteins have been also described previously (17,18). Viral particles were produced in human embryonic kidney 293 T cells using a four-plasmid system (67), collected by ultracentrifugation and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 1% BSA. The particle content of the viral batches was determined by enzyme linked immunosorbent assay for the p24 antigen (Gentaur, France). Viral particles were used at a concentration of 200 000 ng of p24 per μ l in 0.1 M PBS with 1% BSA for intrastriatal injections.

Stereotaxic injection

Rats were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively; i.p.) and placed in a stereotaxic frame. Bilateral stereotaxic injections into the striatum were made using a 30 gage blunt-tip steel needle connected to a 10 μ l Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) via a 30 cm polypropylene catheter. Viral suspensions from the same batch were injected into each striatum at 0.25 μ l/min by means of an automatic injector (Stoelting, Wood Dale, IL, USA), using the following coordinates: 0.8 mm rostral to bregma, 3.5 mm lateral to midline and 4.0 mm ventral to the skull surface, with the tooth bar set at 3.3 mm (27). At the end of the injection, the needle was left in place for 5 min, before being slowly withdrawn.

Brain tissue processing for histological evaluation and biochemical analysis in rats

Histological evaluation

Rats received an overdose of sodium pentobarbital and were transcardially perfused with phosphate buffer containing 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were then post-fixed in 4% PFA for 24 h and then cryoprotected by immersion in 15 and 30% sucrose for 48 h. Coronal sections (thickness 40 μ m) were cut at -22°C using a sliding microtome (Cryocut 1800; Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Free-floating sections encompassing the entire striatum were serially collected and stored in antifreeze cryoprotectant solution at -20°C until immunohistochemical processing. Immunohistochemistry of DARPP-32 (rabbit polyclonal antibody, Chemicon Intl. Inc., diluted 1:5000) and immunohistochemistry of EM48 (mouse monoclonal antibody, MAB5374, Chemicon Intl. Inc., diluted 1:1000) were performed as described previously (27). Immunoreactivity was revealed using the Vectastain ABC Elite System (Vector, Burlingame, CA, USA). The sections were mounted, dehydrated by passing through ethanol and toluene and

coverslipped with Eukitt. COX histochemistry was performed as previously described according to the method of Wong-Riley (68).

Determination of striatal DARPP-32-and COX-depleted volume

The volume of the striatum exhibiting a depletion of DARPP-32 staining was estimated as follows (27,28,69). The unstained area of all serial striatal sections (400 μm apart) was manually delineated using a 4 \times objective and an AX70 microscope (Olympus, Munster, Germany) coupled with an image analysis system. The volume was then calculated according to the principle of Cavalieri using the formula: volume = $d(a_1 + a_2 + a_3 + \dots)$, where d is the distance between serial sections (400 μm), and a_1 , a_2 , a_3 etc. stand for the area showing loss of DARPP-32 immunoreactivity or loss of COX activity ('lesion') within individual serial sections throughout the striatum.

Determination of aggregate numbers

The number of EM48-positive inclusions was quantified as previously described (27) with the following modifications: the inter-section distance was 400 μm (i.e. one in every 10 sections was used) and observations were performed using a 10 \times objective on a Leica DM6000 microscope equipped with a motorized stage and an automated image acquisition and analysis system (Mercator Software, Explora Nova, La Rochelle, France). With this set-up, objects with an apparent cross-sectional area $> 3 \mu\text{m}^2$ (i.e. diameter $> \sim 1.1 \mu\text{m}$) could be reliably detected. Counting and determination of cross-section areas of aggregates were determined for ~ 6000 – $12\,000$ EM48-positive objects per striatum (i.e. 5–9 sections) in 8 rats/group.

SDH histo-enzymatic assay

Animals received an overdose of sodium pentobarbital and the brain was removed and frozen in -25°C isopentane and stored at -80°C . Coronal frozen sections (thickness 20 μm) were cut at -20°C using a cryostat (3035S, Leica Microsystem). Histochemical revelation of SDH activity was performed as described previously (69,70). Succinate was used as the specific substrate, and nitro blue tetrazolium (NBT) was used as electron acceptor, which eventually forms formazan. Serial brain sections were first incubated for 10 min in 0.1 M phosphate buffer and 0.9% NaCl (PBS) at 37°C to activate SDH, which is substantially inactivated by tightly bound oxaloacetate (71). Sections were then rinsed in a large volume of PBS and immersed in the reaction medium containing 5 mM NBT, 0.05 M phosphate buffer (pH 7.6) 0.05 M sodium succinate for 40 min at 37°C . Sections were then rinsed in cold PBS for 5 min, immersed for few seconds in deionized water and air-dried at room temperature. During the staining procedure, care was taken to avoid sunlight, which degrades NBT.

SDH activity analyses

Semi-quantitative analysis of SDH activity in the entire striatum was performed using densitometry analysis (using MCID software) as described previously (69,70). In the case of the analysis of the entire striatum, 8–10 animals per group were examined. For subregional analysis of SDH activity in the striatum based on the visualization of the expression of GFP, acquired image of SDH-stained section was aligned with the adjacent section imaged for GFP fluorescence using a Zeiss Axioplan2 Imaging

microscope, a $\times 1.25$ objective and cooled CCD camera and an image acquisition and analysis system (Mercator, Explora Nova). For each animal, region of interest was delineated on the GFP images (5–12 sections, 200 μm interspace), pasted and translated to be located at the same anatomical level on the SDH image for the determination of optical density in the region. The mean \pm SEM SDH OD unit in the GFP-containing area was calculated from all animals. For these analyses, three to four animals were studied in each group.

3D reconstruction of SDH activity

Images of serial sections revealed for SDH histochemistry were digitized using a flatbed scanner (ImageScanner; GE Healthcare Europe, Orsay, France) with 600 dpi resolution (pixel size $42 \times 42 \mu\text{m}^2$). 3D post-mortem reconstruction was performed using the in-house BrainRAT software freely available on internet (<http://brainvisa.info>) based on a propagative co-registration strategy. On all coronal sections ($n = 18$ serial sections/brain) separated by 200 μm , the loss of staining seen as a palor in the striatum infected with lenti-Htt171-82Q was manually segmented in 3D, and corresponding lateralized areas were symmetrically computed in the control (lenti-Htt171-18Q) striatum. Image processing techniques used were described in previous work (72).

Statistical analysis

All data were expressed as the means \pm SEM. Unpaired Student's *t*-test was used for the comparison between two groups. When more than two groups were compared, a one-way ANOVA with multiple comparisons using the *post hoc* Bonferroni test was carried out using commercially available software (StatView® software, SAS Institute Inc., USA). A two-way ANOVA followed by a *post hoc* Bonferroni/Dunn test was used for the analysis of SDH activity throughout the antero-posterior anatomical extension of the striatum in rats infected with lentiviral vectors. For time-dependent changes in mtDNA levels, data were analyzed by two-way ANOVA (ages/genotypes) and pairwise multiple comparison procedures (Holm-Sidak method). For all statistical tests performed, a probability level of 5% was considered significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by the 'Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives' (CEA) and 'Centre National de la Recherche Scientifique' (CNRS). This work was initiated thanks to a grant from Hereditary Disease Foundation. L.G. was supported by the Neuropôle de Recherche Francilien and the Fondation pour la Recherche Médicale. L.B. was also supported by the Neuropôle de Recherche Francilien. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by CNRS (centre national de la recherche scientifique).

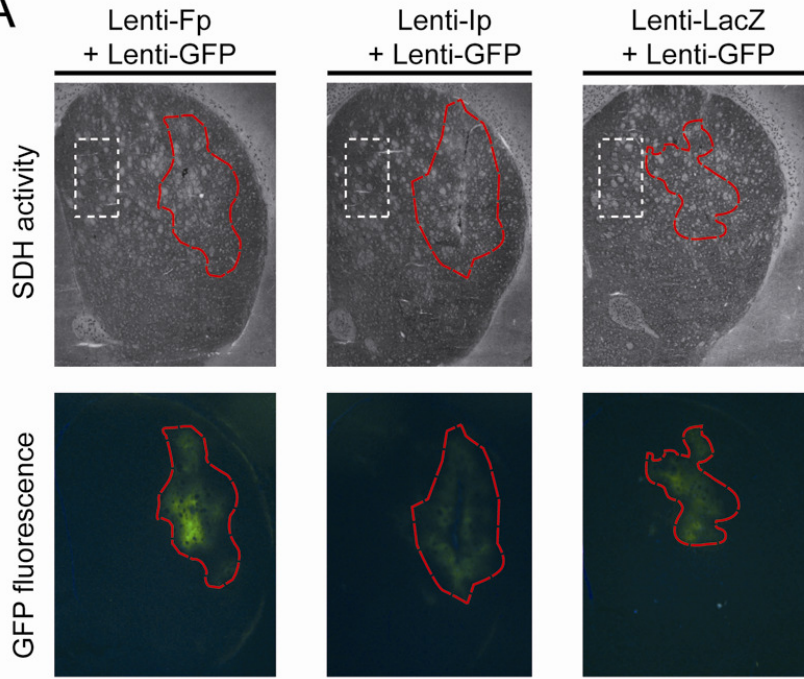
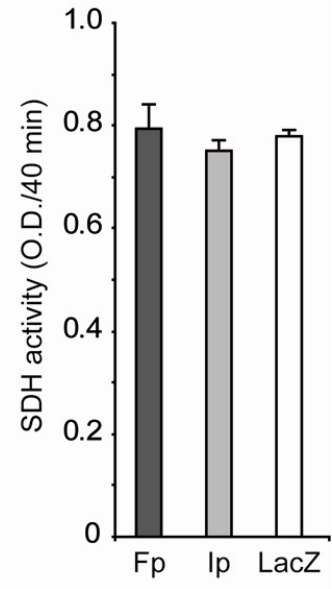
REFERENCES

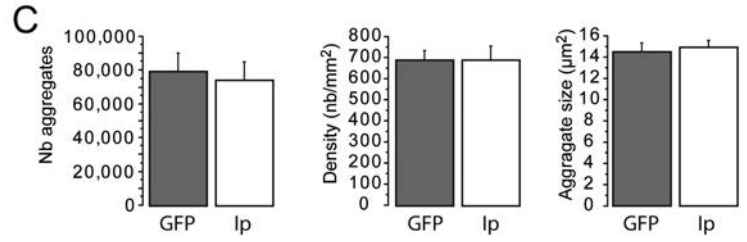
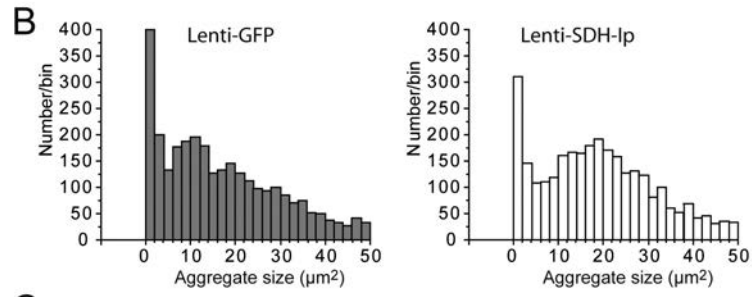
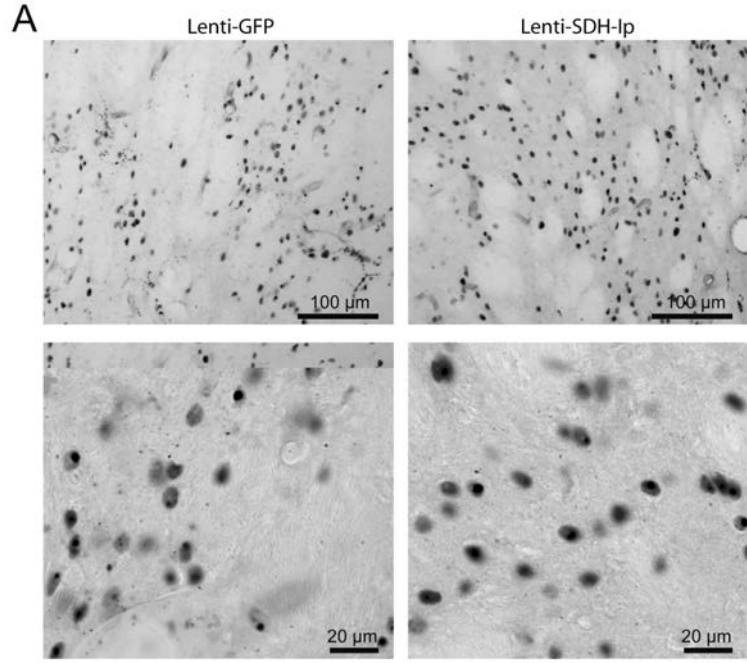
- Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N. and Brouillet, E. (2010) Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**, 52–61.
- Harper, P.S. (1991) Huntington's Disease. WB Saunders Company Ltd, London.
- Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S. and Saudou, F. (2006) Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol. Life Sci.*, **63**, 2642–2660.
- Myers, R.H., Vonsattel, J.P., Stevens, T.J., Cupples, L.A., Richardson, E.P., Martin, J.B. and Bird, E.D. (1988) Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology*, **38**, 341–347.
- Sugars, K.L. and Rubinsztein, D.C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet.*, **19**, 233–238.
- Cowan, C.M. and Raymond, L.A. (2006) Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **75**, 25–71.
- Bossy-Wetzel, E., Petrilli, A. and Knott, A.B. (2008) Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.*, **31**, 609–616.
- Costa, V. and Scorrano, L. (2012) Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO J.*, **31**, 1853–1864.
- Mochel, F. and Haller, R.G. (2011) Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J. Clin. Invest.*, **121**, 493–499.
- Browne, S.E. (2008) Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1147**, 358–382.
- Panov, A.V., Burke, J.R., Strittmatter, W.J. and Greenamyre, J.T. (2003) In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca²⁺-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**, 1–6.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J. and Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.*, **5**, 731–736.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R. *et al.* (2011) Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.*, **17**, 377–382.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N. and Krainc, D. (2006) Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, **127**, 59–69.
- Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D. and Beal, M.F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.*, **41**, 646–653.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.*, **39**, 385–389.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.M., Hirsch, E., Hantraye, P. *et al.* (2006) Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1652–1663.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Diguët, E., Malgorn, C., Gaillard, M.C., Dufour, N., Elalouf, J.M., Krajewski, S., Hantraye, P., Deglon, N. *et al.* (2008) Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1446–1456.
- Orr, A.L., Li, S., Wang, C.E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T. and Li, X.J. (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci.*, **28**, 2783–2792.
- Zabel, C., Mao, L., Woodman, B., Rohe, M., Wacker, M.A., Klare, Y., Koppelstatter, A., Nebrich, G., Klein, O., Grams, S. *et al.* (2009) A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for Huntington disease. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 720–734.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S.W. *et al.* (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493–506.
- Schilling, G., Becher, M.W., Sharp, A.H., Jinnah, H.A., Duan, K., Kotzuc, J.A., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Cooper, J.K., Jenkins, N.A. *et al.* (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 397–407.
- Solans, A., Zambrano, A., Rodriguez, M. and Barrientos, A. (2006) Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 3063–3081.
- Wang, H.Q., Xu, Y.X., Zhao, X.Y., Zhao, H., Yan, J., Sun, X.B., Guo, J.C. and Zhu, C.Q. (2009) Overexpression of F(0)F(1)-ATP synthase alpha suppresses mutant huntingtin aggregation and toxicity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1294–1298.
- Ruiz, M. and Deglon, N. (2012) Viral-mediated overexpression of mutant huntingtin to model HD in various species. *Neurobiol. Dis.*, **48**, 202–211.
- de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P. and Deglon, N. (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J. Neurosci.*, **22**, 3473–3483.
- Diguët, E., Petit, F., Escartin, C., Cambon, K., Bizat, N., Dufour, N., Hantraye, P., Deglon, N. and Brouillet, E. (2009) Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PLoS One*, **4**, e4637.
- Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves, S., Bonvento, G., Brouillet, E., Luthi-Carter, R., Hantraye, P. *et al.* (2009) Sustained effects of nonallele-specific Huntington silencing. *Ann. Neurol.*, **65**, 276–285.
- Canals, J.M., Pineda, J.R., Torres-Peraza, J.F., Bosch, M., Martin-Ibanez, R., Munoz, M.T., Mengod, G., Ernfor, P. and Alberch, J. (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **24**, 7727–7739.
- Majumder, P., Raychaudhuri, S., Chattopadhyay, B. and Bhattacharyya, N.P. (2007) Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **27**, 1127–1145.
- Seo, H., Kim, W. and Isacson, O. (2008) Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, brain-derived neurotrophic factor and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease patients. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3144–3153.
- Butterworth, J., Yates, C.M. and Reynolds, G.P. (1985) Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J. Neurol. Sci.*, **67**, 161–171.
- Mann, V.M., Cooper, J.M., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Jenner, P. and Schapira, A.H. (1990) Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. *Lancet*, **336**, 749.
- Brennan, W.A. Jr, Bird, E.D. and Aprille, J.R. (1985) Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J. Neurochem.*, **44**, 1948–1950.
- Stahl, W.L. and Swanson, P.D. (1974) Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology*, **24**, 813–819.
- Tabrizi, S.J., Cleeter, M.W., Xuereb, J., Taanman, J.W., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann. Neurol.*, **45**, 25–32.
- Turner, C., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. (2007) Clinical correlates of mitochondrial function in Huntington's disease muscle. *Mov. Disord.*, **22**, 1715–1721.
- Scarpulla, R.C. (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 1269–1278.
- Scarpulla, R.C. (2011) Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 1088–1097.
- Au, H.C. and Scheffler, I.E. (1998) Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene—both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *Eur. J. Biochem./FEBS*, **251**, 164–174.
- Hodges, A., Strand, A.D., Aragaki, A.K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L.A., Hartog, C., Goldstein, D.R., Thu, D. *et al.* (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 965–977.
- Kuhn, A., Goldstein, D.R., Hodges, A., Strand, A.D., Sengstag, T., Kooperberg, C., Becanovic, K., Pouladi, M.A., Sathasivam, K., Cha, J.H. *et al.* (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do

- not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 1845–1861.
43. Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 723–749.
 44. Klanner, C., Neupert, W. and Langer, T. (2000) The chaperonin-related protein Tcm62p ensures mitochondrial gene expression under heat stress. *FEBS Lett.*, **470**, 365–369.
 45. Dibrov, E., Fu, S. and Lemire, B.D. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II). *J. Biol. Chem.*, **273**, 32042–32048.
 46. Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmuller, H., D'Adamo, P., Gasparini, P., Strom, T.M., Prokisch, H. *et al.* (2009) SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat. Genet.*, **41**, 654–656.
 47. Gonzalez-Cabo, P., Vazquez-Manrique, R.P., Garcia-Gimeno, M.A., Sanz, P. and Palau, F. (2005) Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2091–2098.
 48. Mao, P., Ardeshiri, A., Jacks, R., Yang, S., Hurn, P.D. and Alkayed, N.J. (2007) Mitochondrial mechanism of neuroprotection by CART. *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 624–632.
 49. Cimen, H., Han, M.J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H. and Koc, E.C. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry*, **49**, 304–311.
 50. Finley, L.W., Haas, W., Desquiret-Dumas, V., Wallace, D.C., Procaccio, V., Gygi, S.P. and Haigis, M.C. (2011) Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One*, **6**, e23295.
 51. Fu, J., Jin, J., Cichewicz, R.H., Hageman, S.A., Ellis, T.K., Xiang, L., Peng, Q., Jiang, M., Arbez, N., Hotaling, K. *et al.* (2012) trans(-)-epsilon-Viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington disease. *J. Biol. Chem.*, **287**, 24460–24472.
 52. Wagner, G.R., Pride, P.M., Babbey, C.M. and Payne, R.M. (2012) Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2688–2697.
 53. Rustin, P., Munnich, A. and Rotig, A. (2002) Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur. J. Hum. Genet.*, **10**, 289–291.
 54. Johri, A. and Beal, M.F. (2012) Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 664–674.
 55. Johri, A., Calingasan, N.Y., Hennessey, T.M., Sharma, A., Yang, L., Wille, E., Chandra, A. and Beal, M.F. (2012) Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 1124–1137.
 56. Xun, Z., Rivera-Sanchez, S., Ayala-Pena, S., Lim, J., Budworth, H., Skoda, E.M., Robbins, P.D., Niedernhofer, L.J., Wipf, P. and McMurray, C.T. (2012) Targeting of XJB-5–131 to mitochondria suppresses oxidative DNA damage and motor decline in a mouse model of Huntington's disease. *Cell Rep.*, **2**, 1137–1142.
 57. Sims, N.R. (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.*, **55**, 698–707.
 58. Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M. and Manfredi, G. (2006) Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.*, **96**, 1349–1361.
 59. D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lenaz, G. and Manfredi, G. (2006) Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2157–2169.
 60. Schagger, H. (ed). (2003) *Membrane Protein Purification and Crystallization*. Academic Press, San Diego, CA.
 61. Wittig, I., Carozzo, R., Santorelli, F.M. and Schagger, H. (2007) Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis*, **28**, 3811–3820.
 62. Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F. and Manfredi, G. (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **277**, 29626–29633.
 63. Srivastava, S., Barrett, J.N. and Moraes, C.T. (2007) PGC-1alpha/beta upregulation is associated with improved oxidative phosphorylation in cells harboring nonsense mtDNA mutations. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 993–1005.
 64. Sambrook, J. (ed). (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Lab Press Plainview, New York.
 65. Bell, E.L., Klimova, T.A., Eisenbart, J., Schumacker, P.T. and Chandel, N.S. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 5737–5745.
 66. Regulier, E., Pereira de Almeida, L., Sommer, B., Aebischer, P. and Deglon, N. (2002) Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.*, **13**, 1981–1990.
 67. Hottinger, A.F., Azzouz, M., Deglon, N., Aebischer, P. and Zurn, A.D. (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J. Neurosci.*, **20**, 5587–5593.
 68. Wong-Riley, M. (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.*, **171**, 11–28.
 69. Bizat, N., Hermel, J.M., Boyer, F., Jacquard, C., Creminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Kajewski, S. and Brouillet, E. (2003) Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **23**, 5020–5030.
 70. Brouillet, E., Guyot, M.C., Mittoux, V., Altairac, S., Conde, F., Palfi, S. and Hantraye, P. (1998) Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.*, **70**, 794–805.
 71. Ackrell, B.A., Kearney, E.B. and Singer, T.P. (1978) Mammalian succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol.*, **53**, 466–483.
 72. Dubois, A., Daguette, J., Herard, A.S., Besret, L., Duchesnay, E., Frouin, V., Hantraye, P., Bonvento, G. and Delzescaux, T. (2007) Automated three-dimensional analysis of histological and autoradiographic rat brain sections: application to an activation study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 1742–1755.

Supplemental figure S1. Estimation of SDH activity in the striatal area expressing recombinant Fp and Ip. **A**, Bright field (SDH histochemistry) or fluorescence images were taken from representative coronal brain sections at the level of the striatum at 6 weeks post-infection with lenti-Fp, lenti-Ip or lenti-LacZ (control). The GFP positive area delineated in red was projected to the histochemistry image to indicate that no major change in SDH activity occurred in the region. **B**, Histograms corresponding to the regional SDH activity measured in the GFP-positive striatum expressing Fp, Ip or β -Galactosidase (LacZ) as a control. Scale bar, 1 mm. SDH activity has been analyzed in 15-25 sections/rat in n=3-4 rats/group. Data are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA (n.s, $p > 0.6$).

Supplemental figure S2. Absence of major effect of Ip overexpression on mutant Htt-containing aggregates *in vivo*. Rats were co-injected with lentiviral vectors encoding mutant Htt171-82Q plus lenti-Ip or lenti-GFP as a control of viral load. Rats were killed at 12 weeks post-surgery and processed for histological evaluation using EM48 immunohistochemistry). **A**, Photomicrographs of EM48-positive aggregates in the two groups of rats at two magnifications (10x and 63x objectives). **B**, Representative distribution histograms of aggregate sizes detected using automated acquisition and image analyse in two rats. Note the two individual distributions are qualitatively similar. **C**, Histograms of the average parameters (n=8/group) indicating no significant differences between the two experimental conditions. Data are mean \pm SEM.

A**B**



VIII. Projet II

Caractérisation des interactions fonctionnelles entre les protéines associées aux formes récessives de la MP, Parkine et PINK1, et la protéine Drp1, principal acteur de la machinerie de fission mitochondriale.

| | |
|--|--------|
| VIII.1 Contexte : Parkine et PINK1 jouent un rôle dans le contrôle de la morphologie mitochondriale | p. 224 |
| VIII.2 Objectifs | p. 226 |
| VIII.3 Méthodologie | p. 227 |
| VIII.3.1 Cultures cellulaires | p. 227 |
| VIII.3.2 Analyse du réseau mitochondrial par microscopie à fluorescence | p. 228 |
| VIII.3.3 Invalidation de l'expression des gènes | p. 229 |
| VIII.3.4 Förster Resonance Energy Transfer, FRET | p. 231 |
| VIII.4 Résultats | p. 235 |
| VIII.5 Discussion et perspectives | p. 243 |
| VIII.6 Article 2 | |

VIII. 1 Contexte : la Parkine et PINK1 jouent un rôle dans le contrôle de la morphologie mitochondriale.

On a introduit dans le chapitre précédent les premiers travaux explorant les conséquences de l'inactivation des gènes *PARK2* et *PARK6* sur la morphologie mitochondriale dans des modèles de drosophile. Ces travaux donnent des indications sur l'existence d'une voie fonctionnelle commune constituée par Parkine et PINK1, visant à promouvoir la fission mitochondriale. Toutefois la valeur absolue de ces premières observations a été mise en cause par des travaux qui ont suivi, réalisés dans différents modèles de cellules de mammifère. A ce jour il existe encore certains points de controverse, et il manque un consensus sur le rôle, profusion ou profission, que les protéines Parkine et PINK1 ont sur la connectivité mitochondriale.

Les résultats les plus importants illustrant ces controverses sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 14).

L'ensemble des travaux publiés à ce sujet indique que les résultats nets sur la morphologie mitochondriale dépendent du contexte cellulaire et des conditions expérimentales. Cette considération est d'autant plus vraie vu que, comme on l'a expliqué dans la section VI – Mécanismes pathogéniques au cours de la MP, les deux protéines peuvent participer aux voies de signalisation intracellulaires qui conditionnent la survie de la cellule dans différents contextes de stress cellulaire.

| Modèle étudié | Effet observé | Référence |
|---|---|--------------------------|
| HeLa : <i>SiPINK1</i> | Fission | Exner N, 2007 |
| Fibroblastes humains : Mutations <i>PARK2</i> | Fusion | Mortiboys H, 2008 |
| COS 7: <i>hPINK se; Si hPINK1</i> | Fission(se); fusion (ARNi) | Yang Y, 2008 |
| SH-SY5Y : <i>Si Parkin Si PINK1</i> | Fission | Lutz AK, 2009 |
| Cellules humaines DA M17 <i>SiPINK1</i> | Fission | Sandebring A, 2009b |
| SH-SY5Y : <i>hPINK se (stable); Si hPINK1 hParkin se après Si hPINK1</i> | Fusion (se); fission (ARNi); Fission | Dagda RK, 2009 |
| Cellules S2R drosophile <i>hParkin se et hPINK1 se</i> | Fission | Ziviani E, 2010 |
| Cellules murines DA N17, <i>hPINK1 se inducible Si hPINK1 ; Si hParkin</i> | Fusion Fission | Cui M, 2010 |
| Neurones d'hippocampe (rats) <i>hPINK1 se hParkin se</i> | Fission | Yu W, 2011 |
| Neurones DA, drosophile : <i>mutPARK2</i> | Enlargement (fusion) | Burman JL, 2012 |

Tableau 14: résumé des résultats issus des études dans lesquelles l'effet de la surexpression (**se**) ou de l'inactivation (**Si**) des gènes *PARK2* et *PARK6* sur la morphologie mitochondriale a été exploré. En caractère gras, les études qui sont en accord avec les résultats de notre article.

Grâce à son activité E3 ubiquitine-protéine ligase, Parkine pourrait avoir un impact sur la morphologie mitochondriale. Plusieurs études révèlent un effet de la Parkine sur les GTPases de la machinerie de fusion/fission mitochondriale. Par exemple, elle est responsable de l'ubiquitylation des MFNs, qui les cible vers la dégradation UPS-dépendante. Par cette dégradation la refusion et la complémentation des mitochondries endommagées sont inhibées. Cette inhibition est considérée une étape qui précède et est indispensable à la mitophagie (Gegg ME *et al.*, 2010; Chen Y *et al.*, 2013; Tanaka A *et al.*, 2010; Ziviani E *et al.*, 2010; Glauser L *et al.*, 2011). L'ubiquitylation des MFNs pourrait avoir lieu en conditions physiologiques, outre que pendant la mitophagie (Glauser L *et al.*, 2011).

En revanche l'interaction entre Parkine et Drp1, et l'éventuelle ubiquitylation de Drp1 par Parkine font encore l'objet de discussions : de fait, en 2011 deux équipes différentes

ont observé dans le même type cellulaire, la lignée SH-SY5Y, des effets opposés (Glaser L *et al.*, 2011; Wang H *et al.*, 2011).

En accord avec leur rôle pendant la mitophagie, lorsque l'effet de Parkine dépend de PINK1 et de son recrutement mitochondrial, certains de ces travaux suggèrent que les effets de Parkine sur la morphologie mitochondriale dépendent aussi de la voie fonctionnelle PINK1/Parkine. Toutefois, plusieurs observations laissent penser que l'action des deux protéines pourrait, au moins en partie, être indépendante.

Plusieurs équipes ont remarqué que la surexpression de *PARK2* compense les défauts provoqués par l'absence de PINK1 et restaure un phénotype mitochondrial normal (Yang Y *et al.*, 2006; Park J *et al.*, 2006; Clark IE *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que l'action de Parkine pourrait aussi être indépendante de sa localisation mitochondriale et de PINK1. De la même manière, l'effet de PINK1 sur la mitochondrie pourrait être direct et indépendant de la Parkine, vu que chez la drosophile la surexpression de *Ndp1*, codant une protéine analogue à la NADH déshydrogénase de la levure, contrecarre les dégâts mitochondriaux provoqués par l'ablation de *PINK1*, mais pas de *PARK2* (Vilain S *et al.*, 2012).

VIII.2 Objectifs

Nous avons revisité le rôle des protéines Parkine et PINK1 dans la dynamique mitochondriale. Par la combinaison de stratégies pharmacologiques et de biologie moléculaire, et utilisant différents outils d'imagerie microscopique, nous avons exploré les interactions fonctionnelles et moléculaires qui ont lieu entre les trois protéines dans des cellules COS7, dans différents contextes bioénergétiques.

Nous avons essayé de répondre aux questions suivantes : 1) est ce que Parkine et PINK1 ont un effet pro-fusion ou profission constant dans notre modèle cellulaire ; 2) est-ce que l'effet de Parkine et PINK1 sur la dynamique mitochondriale s'explique par l'interaction avec les protéines appartenant à la machinerie de fusion et fission mitochondriale ; parmi les protéines de cette machinerie, j'ai choisi de me focaliser sur la protéine Drp1, principal acteur de la fission mitochondriale ; 3) est ce que Parkine et PINK1 coopèrent dans une voie unique, visant à équilibrer la balance de la dynamique de fusion et de

fission mitochondriale ; 4) est ce que les interactions mises en évidence sont modulées par les conditions bioénergétiques de la mitochondrie ?

VIII.3 Méthodologie

VIII.3.1 Cultures cellulaires

Nous avons choisi de travailler avec les cellules COS7, issues de fibroblastes rénaux de singe, parce que ce sont des cellules plates avec un large cytoplasme et un réseau mitochondrial développé, des caractéristiques idéales pour des études de morphologie. Nous avons transfecté les cellules afin d'induire de manière transitoire la surproduction des protéines en cours d'étude. En comparaison avec la surexpression constitutive, les modèles transitoires offrent en effet l'avantage de mettre en évidence les effets aigus relatifs aux gènes et aux protéines étudiées dans des délais brefs (de 12h à 72h, dans notre étude), avant que des mécanismes compensatoires secondaires s'activent dans la cellule.

Les cellules de la lignée COS7 sont des cellules adhérentes qui sont maintenues à 37°C en présence de CO₂ (5%), et cultivées dans un milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté par du sérum de veau fœtal (10%), de la pénicilline/streptomycine (100 µg/ml, Invitrogen) et de la glutamine (2mM, Invitrogen).

Pour le maintien en culture, les cellules sont régulièrement trypsinisées et passées, deux fois par semaine dans des boîtes de pétri de 10cm, à une concentration de 1×10^6 . Afin d'effectuer les analyses d'immunofluorescence, les cellules sontensemencées sur des lamelles, dans des plaques de 24-puits, à une densité de 4×10^4 par puits.

Pour la transfection, nous avons utilisé le liposome DMRIE-C (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. Les particules du liposome DMRIE-C, chargées positivement, forment des complexes avec les molécules d'ADN, qui facilitent l'entrée de l'ADN dans les cellules. En alternative, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a été utilisée lors des co-transfections d'ADN et ARN (SiARNs), comme conseillé par les protocoles.

Toutes les transfections ont été effectuées dans un milieu sans sérum (OPTI-MEM).

Dans le cas des transfections d'ADN, le milieu contenant les plasmides et le réactif remplace le milieu de culture normal pendant environ 5 heures, au bout desquelles la transfection est donc arrêtée. Dans le cas des co-transfections ADN et SiARNs, la solution de transfection est ajoutée au milieu de culture, dépourvu d'antibiotiques,

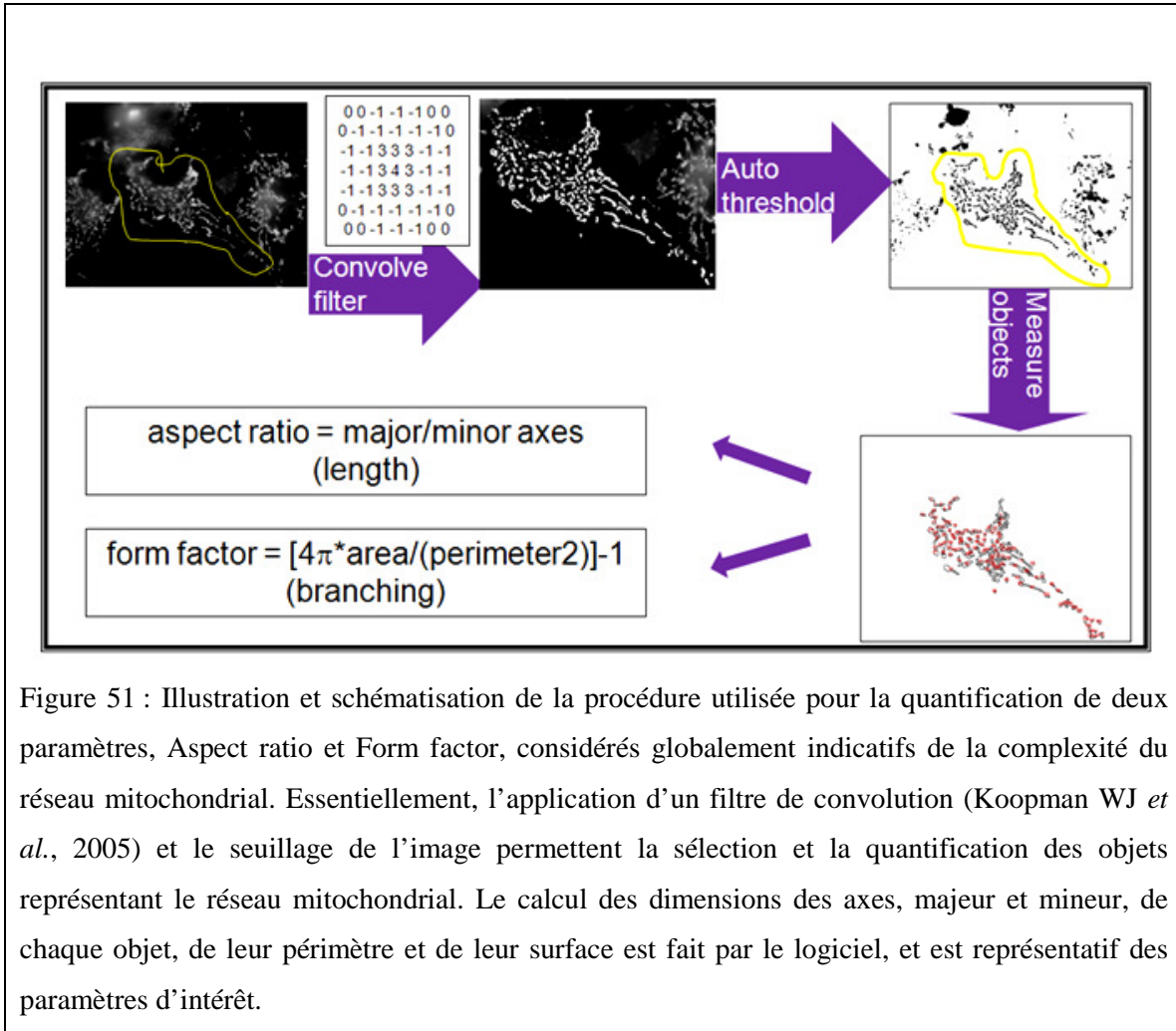
pendant la durée souhaitée. Aux temps indiqués après la transfection, différents selon le protocole expérimental, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldehyde (4%). Après la fixation, les cellules sont incubées en présence de sérum normal de chèvre (10%), puis avec les anticorps primaires, pendant la nuit, à 4°C.

Après lavages répétitifs dans une solution PBS (pour Phosphate Buffered Saline), les cellules sont incubées pendant 45 minutes à température ambiante avec les anticorps secondaires ; suivent quatre lavages supplémentaires. Les lamelles sont enfin montées sur des lames à l'aide d'un milieu de montage spécifique, FluoroGold (Invitrogen).

VIII.3.2 Analyse du réseau mitochondrial par microscopie à fluorescence

L'analyse de la morphologie mitochondriale a été réalisée sur les photos des cellules, prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Allemande) avec un objectif 63 x à huile, à l'aide du logiciel Explora Nova Fluo'Up (Explora Nova, La Rochelle, France). Le réseau mitochondrial a été visualisé par le réactif MitoTracker ou par la surexpression de l'ADNc de la protéine GFP (pour Green Fluorescent Protein), ciblée à la mitochondrie par l'ajout d'une séquence d'adressage à la mitochondrie, comme indiqué dans l'article. La catégorisation des cellules sur la base de l'aspect, fusionné ou plus ou moins fragmenté, de leur réseau mitochondrial a été accompagnée de l'analyse de deux paramètres « Aspect ratio » et « Form factor », à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland). Nous avons considéré ces deux paramètres comme globalement indicatifs de la complexité du réseau. L'analyse de ces paramètres a été rapportée par Koopman en 2005, qui en décrit la méthodologie et son application à l'évaluation de la longueur et du branchement des mitochondries de fibroblastes déficients en Co I à partir de photos prises au microscope confocal (Koopman WJ *et al.*, 2005). A la différence de Koopman, nous avons, comme d'autres (Agier V *et al.*, 2012), travaillé sur des photos obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence et calculé ces deux paramètres, les considérant comme indicatifs du degré de fragmentation ou de fusion du réseau mitochondrial pris dans sa globalité. Les différences observées avec cette approche sont constantes et cohérentes : par exemple, en accord avec les données de la littérature, nous avons observé une fusion du réseau mitochondrial lors de la mise en carence nutritionnelle de cellules en culture, et une fragmentation du réseau lors d'un

traitement dépolarisant (Gomes LC *et al.*, 2011; Cereghetti GM *et al.*, 2008). La procédure utilisée est schématisée dans la figure 51.



VIII.3.3 Invalidation de l'expression des gènes

Dans les expériences comprenant une stratégie d'ARN interférence (SiPINK1) nous avons utilisé le système spécifique 'stealth siRNA' et 'stealth universal negative control' (Invitrogen). Les stealth siRNAs *PINK1* (HSS127945), validés par la maison productrice, ont été utilisés selon les instructions du fournisseur. Le système 'Stealth RNAi™ siRNA' utilise des méthodes de biochimie 'next-generation' RNAi pour dessiner les séquences des siARNs. L'invalidation effective du gène cible, la spécificité et la stabilité des séquences choisies, ainsi que des niveaux faibles de toxicité cellulaire sont assurées par le

producteur, ce que nos expériences ont confirmé. Chaque amorce (oligo) est synthétisée sous forme de simple brin, contrôlée par spectrométrie de masse et apparié en duplex dans une étape successive.

Les stratégies de i) *knock down* (KD), basée sur le principe d'ARN interférence, ou ii) *knock out* (KO) ou *knock in* (KI), basées sur le principe de recombinaison homologue, sont largement utilisées par les scientifiques pour invalider des gènes spécifiques afin d'étudier leur fonction.

L'ARN interférence est un mécanisme physiologique conservé chez les eucaryotes, reproductible *in vitro* : des séquences d'ARN spécifiques pour le gène cible sont transfectées dans les cellules. L'ARN peut transitoirement former un double brin, qui interagit à son tour avec le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Cette machinerie, schématisée dans la figure 52, sert comme un mécanisme pour régler à la fois la stabilité et la traduction de l'ARN messagère.

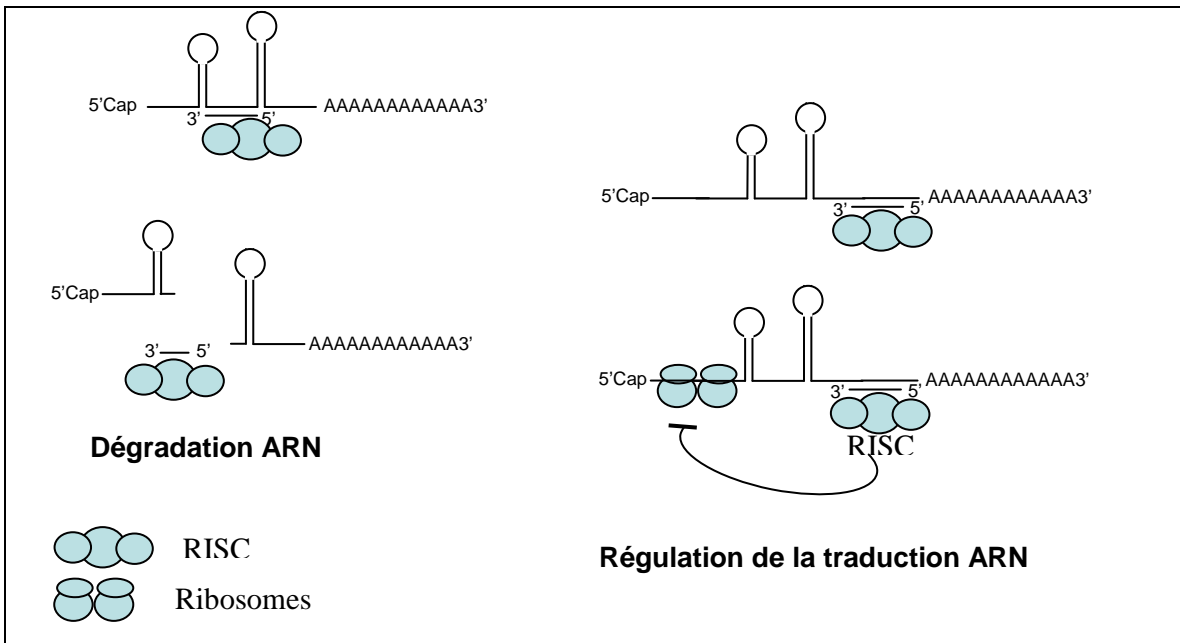


Figure 52 : mécanismes d'ARN interférence et machinerie RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Deux situations sont possibles : à la suite de l'appariement parfait entre le complexe miRNA-RISC et l'ARNm cible, la destruction de ce dernier a lieu par l'activité endoribonucléase du complexe RISC (gauche) ; lorsque le complexe miRNA-RISC est apparié de manière imparfaite, ou lorsqu'il s'apparie à une séquence 3' non codante de l'ARNm cible (droite) on obtient le blocage de la traduction.

Deux stratégies expérimentales existent pour mettre en œuvre l'interférence ARN : i) utilisant de siRNA (pour « small interfering RNA ») soit l'introduction de courtes séquences (21-24 nt) d'ARN double brin ; ii) ou la transfection d'un transgène ADN codant un ARN formant une épingle à nourrice, le shRNA (short hairpin RNA), qui mûrira en ARN interférant par l'action d'enzymes spécifiques (Fig. 53).

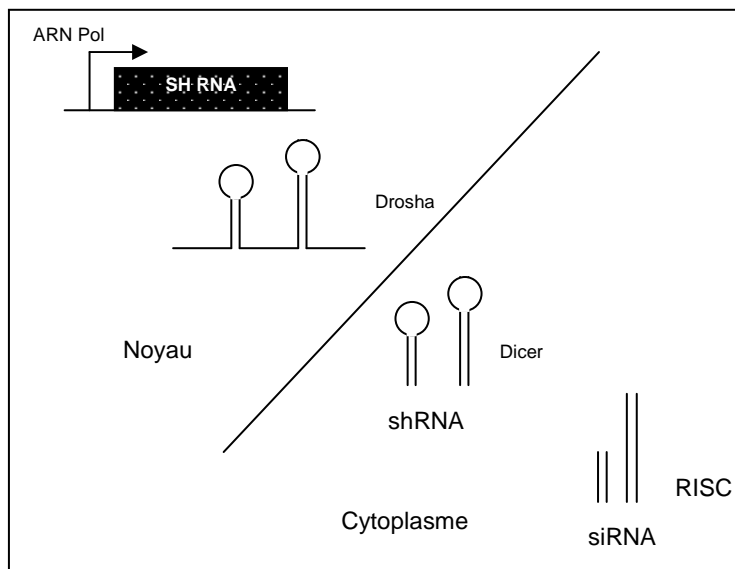


Figure 53 : naissance des shRNAs et maturation en siRNAs suite à l'action des enzymes RNAases (Drosha et Dicer). Après maturation les siRNAs sont activés par l'interaction fonctionnelle avec le complexe RISC.

Le choix entre les deux stratégies d'ARN interférence dépend du contexte expérimental : les siRNAs sont introduits facilement dans les cellules, mais l'interférence est uniquement possible dans un contexte transitoire. Cette stratégie est plus indiquée lorsque l'invalidation de l'expression d'un gène risque d'exercer des effets toxiques.

VIII.3.4 Förster Resonance Energy Transfer, FRET

Les interactions protéine-protéine, qu'elles soient provoquées par des modifications covalentes de protéines ou non, sont généralement considérées médiatrices des fonctions cellulaires et des voies de signalisation. L'analyse de ces processus a été limitée pendant longtemps aux méthodes biochimiques, comme par exemple l'immunoprécipitation, les essais de *pull down* et de *cross-linking*. Ces techniques ne fournissent pas d'information

spatiale et les interactions détectées dépendent de la stabilité du complexe pendant les conditions expérimentales en dehors de la cellule, dans des homogénats.

Les techniques de microscopie basées sur la détection de protéines marquées par immunofluorescence ou des marqueurs fluorescents, tels que la protéine GFP, fournissent des informations spatiales à l'échelle du micromètre ; elles ne donnent pas de données conclusives pour la présence d'interactions fonctionnelles protéine-protéine.

Le transfert d'énergie de résonance de fluorescence, Förster Resonance Energy Transfer, FRET, est un processus photophysique qui fournit des informations sur la localisation spatiale des protéines, permettant en même temps l'obtention d'informations sur les interactions protéine-protéine (Clegg RM, 1995). L'utilité de cette technique réside dans la possibilité de détecter l'interaction entre deux protéines séparées par une distance comprise entre 1 et 10 nm.

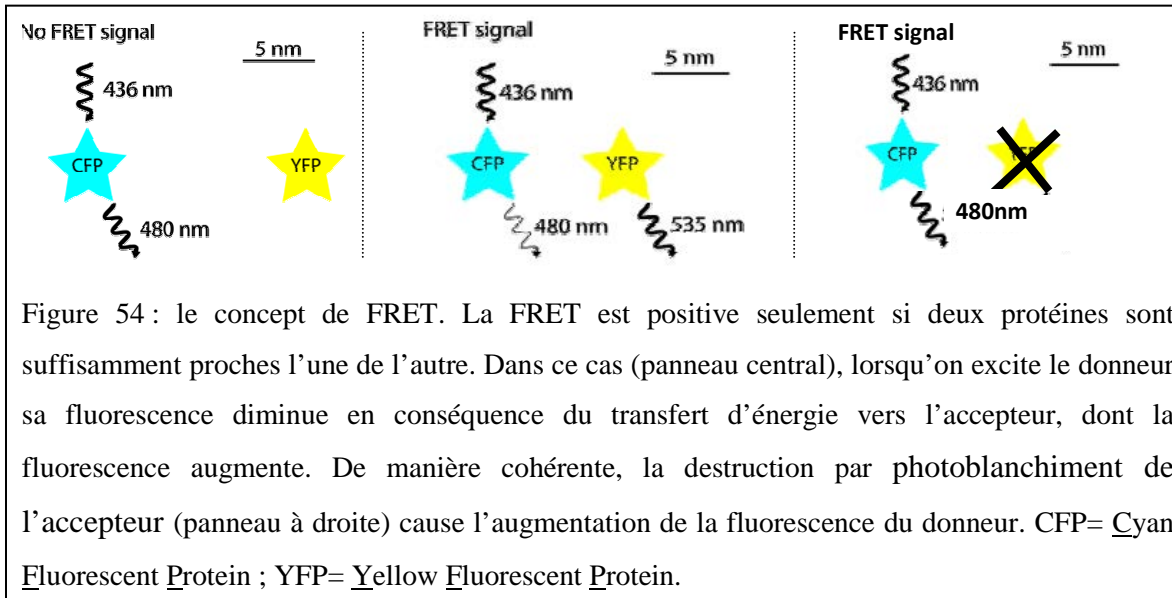
La FRET est un processus par lequel l'utilisation des radiations ionisants n'est pas nécessaire : un fluorophore donneur excité transfère l'énergie à un accepteur par couplage dipôle-dipôle (Förster T, 1948). Le transfert d'énergie a donc lieu seulement si les deux protéines sont suffisamment proches l'une de l'autre, lorsque la diminution de la fluorescence du donneur s'accompagne de l'augmentation contemporaine de la fluorescence de l'accepteur, démontrant l'existence de FRET (Snapp EL and Hedge RS 2006; Wouters FS and Bastiaens PI 2006).

Pour un couple de fluorophores, donneur et accepteur, la probabilité de FRET lors de l'excitation du donneur est de $1 / [1 + (r/R_0)^6]$, où r est la distance séparant les fluorophores, et R_0 est la distance à laquelle une probabilité de FRET de 50% est observée (la distance de Förster (Förster T, 1948)).

En théorie, deux états différents des fluorophores peuvent être discriminés : la FRET est efficace (positive) lorsque donneur et accepteur sont à proximité, ou aucune FRET n'est possible (Fig. 54). Toutefois la FRET mesure le transfert d'énergie moyenne dans une région de la cellule qui correspond à un très grand nombre de molécules de donneur et d'accepteur. Les résultats donnent donc des valeurs intermédiaires.

L'optimisation de la FRET est nécessaire sur la base de plusieurs critères : par exemple l'idéal est de choisir une couple de fluorophores avec une distance de Förster de 5nm ; en outre, les fluorophores ne doivent pas interagir entre eux, pour éviter d'introduire un biais

dans la mesure des interactions entre les protéines détectées par immunofluorescence ; enfin il est important que le spectre d'émission de fluorescence du chromophore donneur soit en partie superposé au spectre d'absorption de fluorescence du chromophore accepteur. Le nombre d'observations doit aussi être optimisé, normalement, l'augmentation de ce nombre réduit la probabilité d'erreurs d'interprétation des résultats. La mesure de la FRET avant et après l'utilisation du photoblanchiment de l'accepteur, la FRET est une méthode largement utilisée. Par cette méthode, le transfert d'énergie est révélé par la destruction, par photoblanchiment, de l'accepteur. La mesure de la fluorescence du donneur doit augmenter après la destruction de l'accepteur si les deux sont suffisamment proches (Fig. 54).



Dans notre protocole expérimental les fluorophores choisis étaient couplés aux anticorps secondaires utilisés pour l'immunodétection des protéines en question. Les images ont été acquises avec un microscope confocal Leica SP5 (Leica, Allemagne) et un objectif à immersion dans l'huile, 63 x. La région d'intérêt, ROI, a été dessinée à l'aide du logiciel Leica Confocal Software. Le photoblanchiment de la ROI a été effectué avec un laser Helium Néon, à 543 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde de la fluorescence de l'accepteur. L'intensité (I) de fluorescence (F) du donneur (D) a été quantifiée à partir de photos par le logiciel ImageJ, et l'efficacité de FRET a été déterminée selon la formule :

% FRET = (ID postblanchiment – ID preblanchiment)/ID postblanchiment. La FRET a été considérée positive lorsque FD postblanchiment > FD preblanchiment.

VIII.4 Résultats

Nous avons observé que dans les cellules COS7 la présence des protéines Parkine et PINK1 exogènes facilite la fission du réseau mitochondrial dans un contexte bioénergétique normal (article, Fig. 1). Afin de comprendre si l'effet profission observé en présence de Parkine et PINK1 dépend de l'action de la GTPase de la machinerie de fission mitochondriale, Drp1, nous avons utilisé le mutant Drp1 K38A, qui a un effet dominant négatif. Cela nous a permis d'observer l'abolition de l'effet profission de Parkine et de PINK1 (article, Fig 2).

Nous avons alors décidé d'explorer comment, plus spécifiquement, Parkine peut moduler l'activité de la protéine Drp1.

La protéine Drp1 est la cible de plusieurs mécanismes de modifications post-traductionnelles qui règlent son activité : phosphorylation, S-nitrosylation, SUMOylation, ubiquitylation, O-GluNACylation. La régulation de la phosphorylation de Drp1 implique plusieurs résidus de serine et la convergence de plusieurs voies de signalisation. La phosphorylation des résidus de serine S616 et S637, respectivement par la kinase 1 dépendant de la Cycline (Cyclin Dependent Kinase 1, Cdk1) et par la protéine kinase A (PKA) a des effets opposés : la phosphorylation de la serine S616 et la déphosphorylation de la serine S637 par la phosphatase Ca^{2+} -dépendante Calcineurine favorisent toutes deux la fission mitochondriale (revu dans Otera H *et al.*, 2013). De plus, plusieurs isoformes de la protéine existent, et la phosphorylation de l'isoforme 3 de la sérine 600, correspondant à la sérine 637 de l'isoforme 1, dépend de la protéine kinase Ia dépendante de Ca^{2+} / Calmoduline et favorise la fragmentation mitochondriale (Han XJ *et al.*, 2008; revu dans Otera H *et al.*, 2013). Ces mécanismes de régulation, autant élégants que compliqués, indiquent l'importance que la fission mitochondriale revête vis-à-vis de la détermination des réponses intracellulaires en différentes situations. Ils sont représentés schématiquement dans la figure 55.

Différents agents pharmacologiques peuvent être utilisés pour manipuler l'état de phosphorylation du résidu S637. Nous avons décidé d'explorer comment l'état d'activation de Drp1 affecte la morphologie cellulaire en présence et en absence de Parkine exogène (Fig. 55).

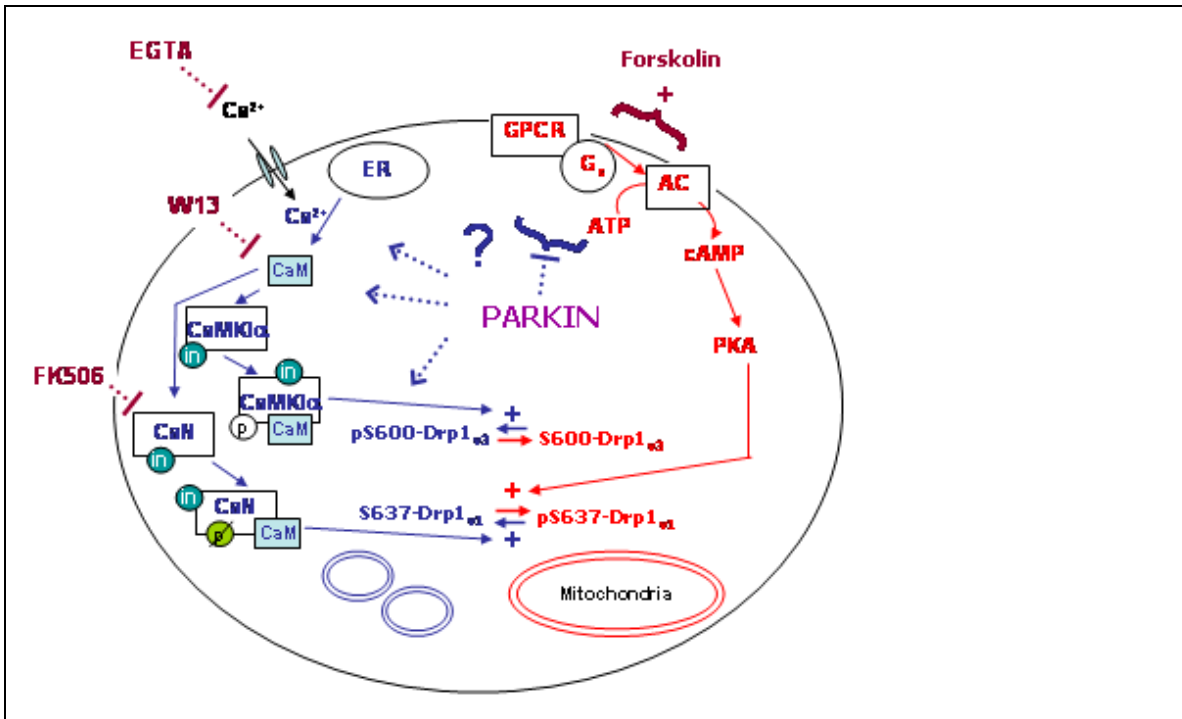


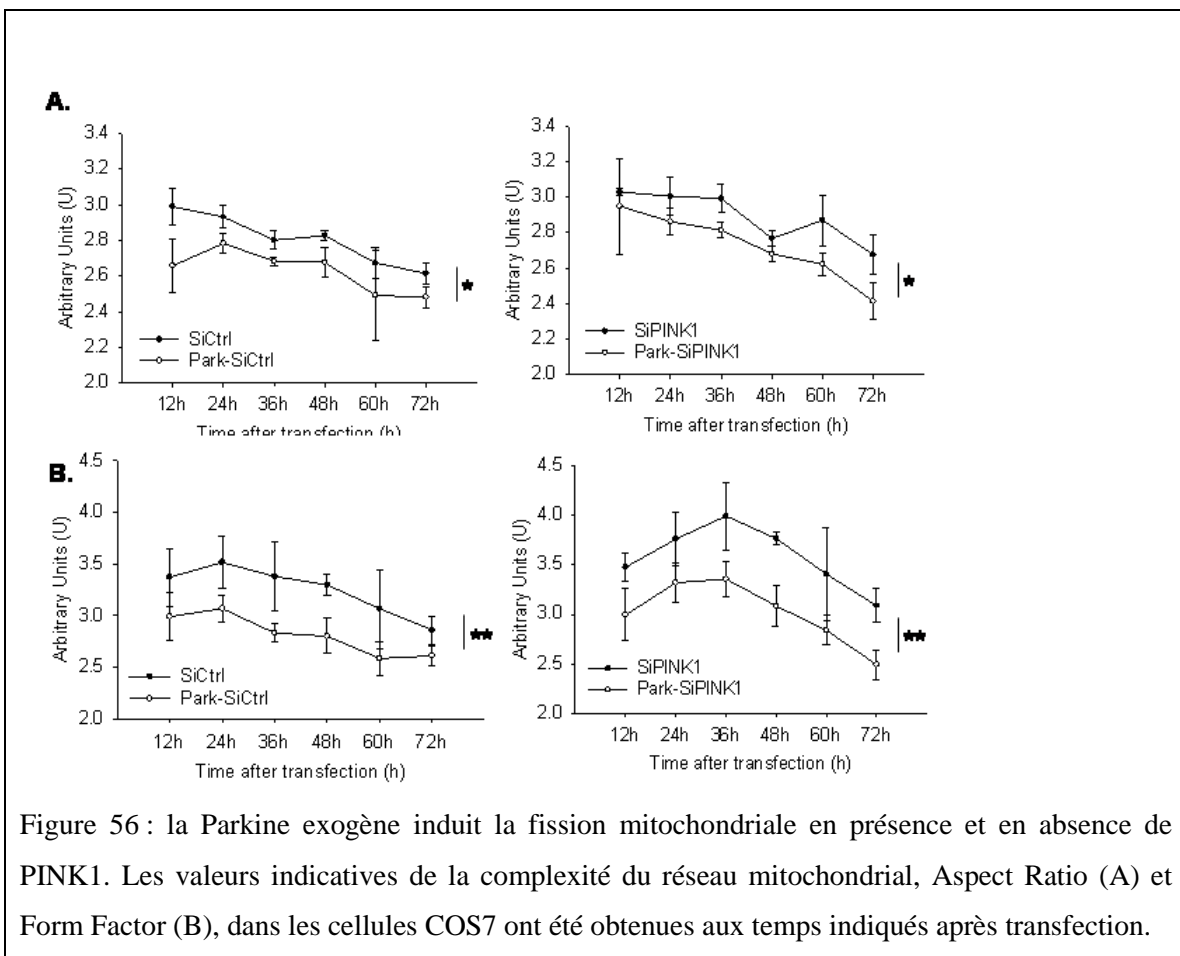
Figure 55 : diagramme illustrant les voies – Ca^{2+} /Calmoduline (CaM)/Calcineurine (CaN), cAMP/PKA et CaM kinase Ia - impliquées dans la phosphorylation de l'isoforme 1 (S637-Drp1_{v1}) ou de l'isoforme 3 (S600-Drp1_{v3}) de Drp1, et les étapes modifiées par les agents pharmacologique utilisés. Les effets de Parkine et des voies favorisant la fission sont indiqués en bleu. Les voies de signalisation qui inhibent la fission sont indiquées en rouge. ER, réticulum endoplasmique ; in = domaine autoinhibiteur ; \emptyset et \oplus = sites catalytiques de la CaN ou de la CaMKIIα libérés à la suite de l'interaction avec la CaM ; GPCR = récepteur couplée à la protéine G ; Gs = protéine G stimulatrice ; AC = adénylate cyclase ; cAMP = AMP cyclique ; PKA = protéine kinase A.

Afin d'inhiber les différentes étapes qui portent à l'activation de Drp1, facilitant la déphosphorylation du résidu S637 de l'isoforme 1, nous avons donc utilisé différents agent pharmacologiques : l'inhibiteur de la calcineurine, le FK506 ; l'inhibiteur de la calmoduline, le W13 ; le chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA. En alternative nous avons aussi utilisé la forskoline, qui augmente l'activité de la PKA, facilite la phosphorylation du même résidu et, par conséquent, inhibe la fonction de Drp1.

Nous avons ainsi montré que ces agents abolissent l'effet pro-fission de la Parkine exogène, alors qu'ils ont un effet négligeable dans les cellules contrôles (article, Fig 4 A, B et C).

Par une stratégie d'inactivation de l'expression de gènes par ARN interférence, nous avons ensuite exploré la possibilité que l'effet de Parkine sur la morphologie mitochondriale puisse être indépendant de PINK1. Nos résultats montrent que a) l'inactivation de la fonction de *PINK1* cause un effet profusion ; b) l'effet pro-fission de Parkine persiste, même en absence de PINK1 (article, Fig. 5A).

Pour confirmer ces résultats, nous avons exploré l'effet profission de Parkine par l'observation de la morphologie mitochondriale au cours du temps, entre 12 et 72 heures après la transfection. Ces résultats sont rapportés ici et représentés dans des graphiques séparés pour une plus grande clarté (Fig. 56 ; article Fig. 5A).



D'autre part, l'analyse ponctuelle des valeurs obtenues dans les différents contextes expérimentaux 48h après la transfection indique la persistance de l'effet pro-fission de Parkine en absence de PINK1 (Fig. 57).

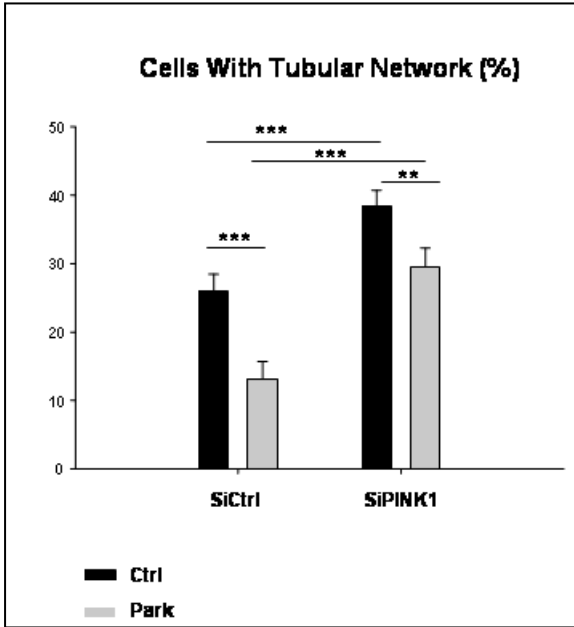


Figure 57 : en présence de la Parkine exogène, les cellules COS7 présentent un réseau mitochondrial significativement plus fragmenté en comparaison aux cellules contrôles. Cette différence persiste après invalidation de l'expression de *PINK1*. (Cellules fixées 48 heures après la transfection Graph représentatif de la moyenne de 8 expériences ; ***= $p < 0.01$; **= $p < 0.02$)

En accord avec ces observations, nous avons aussi montré que l'effet des inhibiteurs de l'activité de Drp1 sur les modifications induites par Parkine persiste en absence de PINK1 (article, Fig. 5B et 5C). Ces résultats suggèrent que l'action de Parkine sur la fragmentation mitochondriale dépendante de Drp1 ne nécessite pas de PINK1, tandis que pendant la mitophagie, Parkine et de PINK1 agissent comme une voie fonctionnelle unique.

Nous avons ensuite exploré les interactions entre Parkine, PINK1 et Drp1, dans le contexte de la mitophagie. Utilisant le CCCP, pour découpler les mitochondries, nous avons confirmé que Parkine facilite la mitophagie (article, Fig. 6 A). Dans ces conditions, comme déjà observé précédemment (Tanaka A *et al.*, 2010), nous avons observé que l'efficacité de la mitophagie est réduite par l'absence de Drp1 (article Fig. 6 C). En revanche, la phase de formation des agrégats périnucléaires qui précède la dégradation mitochondriale n'est pas affectée par l'absence de Drp1 (article, Fig .6 A et B).

Nous avons ensuite exploré l'effet de deux formes de Parkine, portant des substitutions R275W et G328E. Ces deux variants se sont révélés incapables de promouvoir la fission mitochondriale (article, Fig. 7A, B et C) ; en revanche, le variant G328E conserve intacte sa capacité de promouvoir la mitophagie, ce qui indique que l'effet profission de la Parkine n'est pas nécessaire à la mitophagie (article, Fig. 7E).

Enfin, en utilisant la FRET nous avons montré une proximité physique entre Parkine et Drp1, dépendante du contexte bioénergétique mitochondrial. En effet, dans un contexte bioénergétique mitochondrial normale (conditions basales) de faibles niveaux de FRET ont été mis en évidence entre Parkine et Drp1, en revanche ces niveaux étaient significativement plus élevés dans un contexte de mitophagie, en présence de CCCP (article, Fig. 8A, B et D). Dans les deux cas la présence de FRET entre Parkine et Drp1 semble dépendre de la présence de PINK1 (article, Fig 8E).

Les deux variants de Parkine ne sont pas capables d'interagir avec Drp1 en absence de CCCP (article, Fig. 8C et D) ; en présence de CCCP cependant, les niveaux de FRET indiquent que Drp1 et le variant G328E sont retrouvés à proximité (article, Fig. 8C et D). De plus, en conditions de base une proximité physique entre les protéines PINK1 et Drp1 est aussi observée. Cette interaction est renforcée en présence de CCCP (article, Fig. 9A, B et C). Il est aussi à noter que la présence de Parkine module l'interaction entre PINK1 et Drp1 (article, Fig. 9C) : aucune FRET est observée entre PINK1 et Drp1 après l'inactivation de *PARK 2* par une stratégie de SiRNA ; ainsi, en présence du variant R275W de Parkine les niveaux de FRET entre PINK1 et Drp1 sont significativement plus faibles qu'en présence de Parkine normale ; ceci est vrai que les cellules soient traitées ou non par le CCCP (article, Fig. 9B).

Notre plan de travail est schématisé en forme de « flow-chart » dans les figures suivantes.

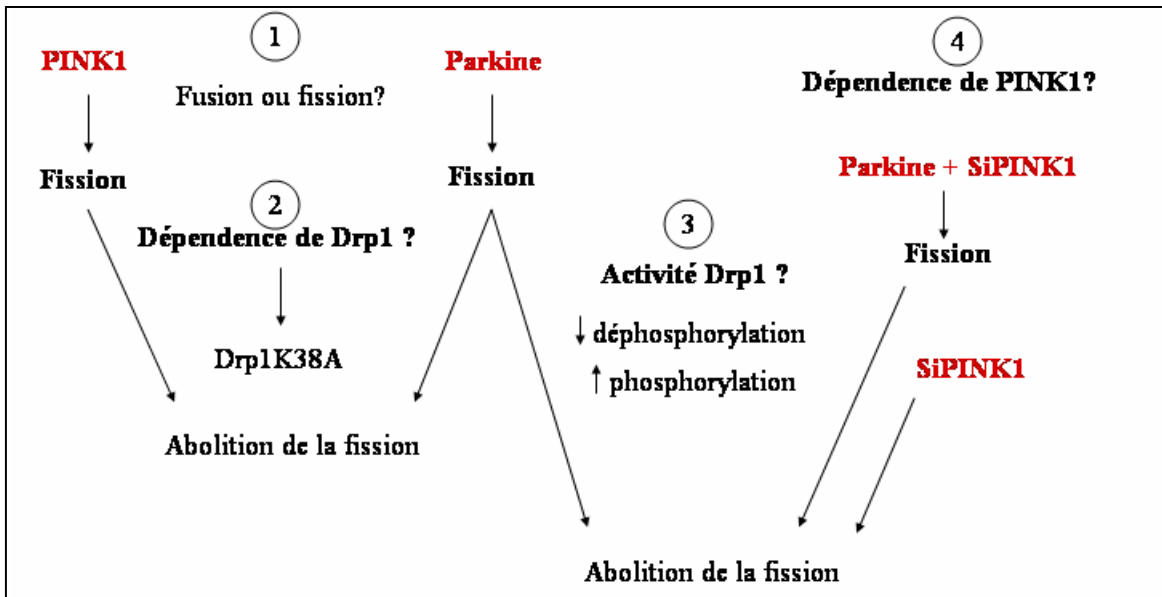
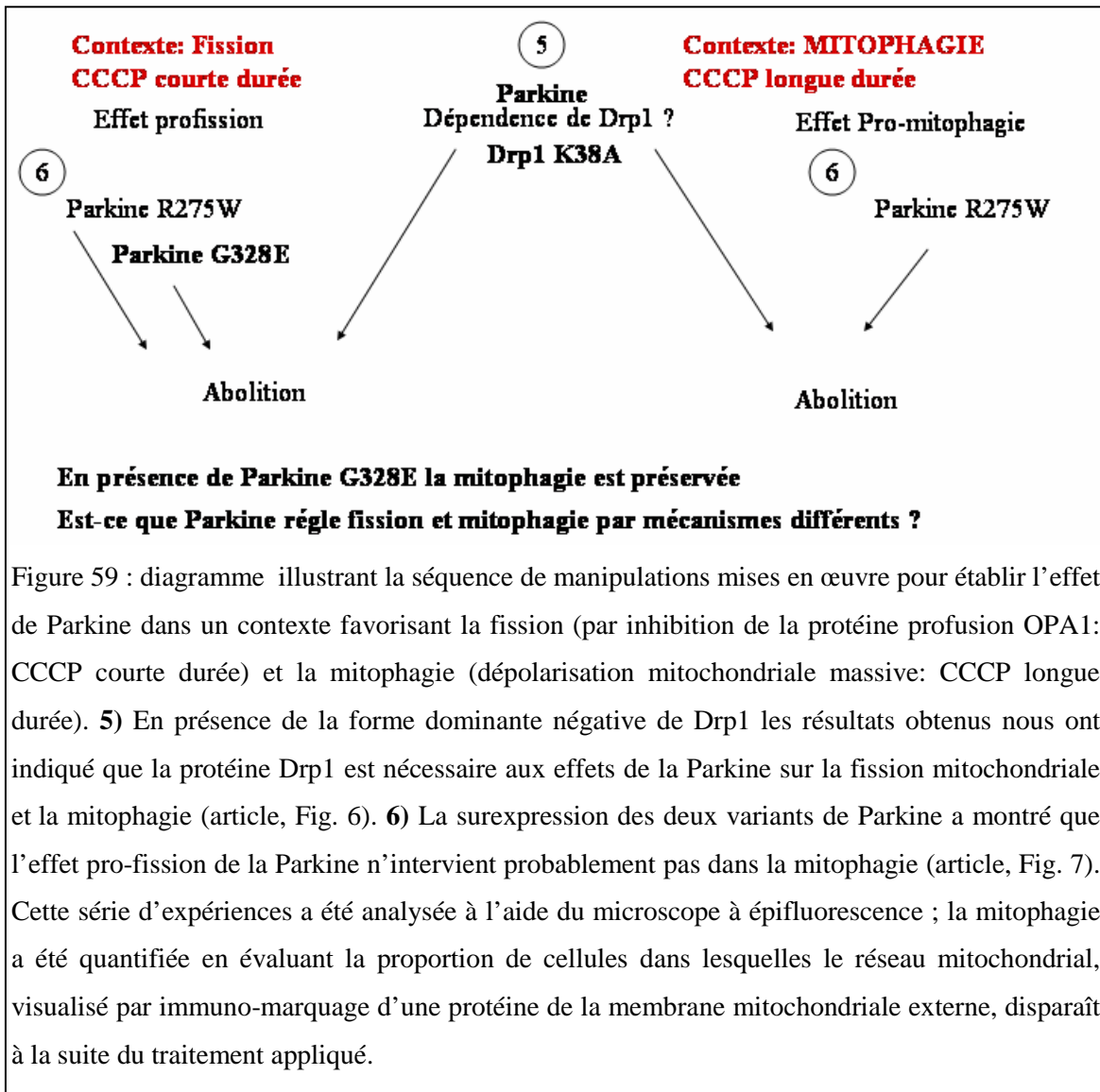


Figure 58 : diagramme illustrant le plan expérimental mis en œuvre pour évaluer le rôle de Parkine et PINK1 en conditions de base. Les cellules COS7 ont été transfectées par les plasmides codants les protéines d'intérêt. La surexpression de la protéine GFP ciblée, à la mitochondrie par une séquence d'adressage spécifique (MTS, pour Mitochondrial Targeting Sequence), a été utilisée pour visualiser les mitochondries. **1)** Plusieurs grades de fragmentation mitochondriale ont été observés et quantifiés dans les cellules en présence des protéines exogènes (article, Fig. 1). **2)** A la suite de l'invalidation de la fonction de Drp1, nous avons compris que Parkine et PINK1 facilitent la fission mitochondriale par l'intermédiaire de Drp1 (article, Fig. 2). **3)** L'inhibition pharmacologique des différentes étapes qui portent à l'activation de Drp1 nous a indiqué l'implication d'une interaction fonctionnelle, probablement indirecte, entre Parkine et Drp1 par l'intermédiaire de voies de signalisation (article, Fig. 4). **4)** Combinant cette stratégie pharmacologique à une stratégie d'invalidation de l'expression de *PINK1*, nous avons montré que l'effet de la Parkine sur la morphologie mitochondriale est au moins partiellement indépendant de PINK1 (article, Fig. 5).



| Contexte: Fission No CCCP | | Contexte: MITOPHAGIE CCCP longue durée | |
|------------------------------|----|---|-----------------------|
| FRET: Parkine Drp1 | | | |
| 1. | | | |
| parkine | + | ++ | parkine |
| parkine R275W | - | - | parkine R275W |
| parkine G328E | - | ++ | parkine G328E |
| FRET: Parkine Drp1 | | | |
| 2. | | | |
| parkine | | | parkine |
| +SiPINK | - | + | +SiPINK |
| FRET: PINK1 Drp1 | | | |
| 3. | | | |
| PINK1 | + | + | PINK1 |
| PINK1 + parkine | ++ | ++ | PINK1 + parkine |
| PINK1 + parkine R275W | - | + | PINK1 + parkine R275W |
| PINK1 + parkine G328E | ++ | ++ | PINK1 + parkine G328E |

Figure 60 : diagramme illustrant la séquence d'expériences analysées, à l'aide du microscope confocal, afin de révéler des interactions physiques entre les protéines d'intérêt, dans les différents contextes expérimentaux (prolifération et mitophagie) (article Fig. 8 et 9).

VIII.5 Discussion et perspectives

Notre travail porte sur la clarification des mécanismes par lesquels les protéines impliquées dans les formes récessives à début précoce de la MP, Parkine et PINK1, coopèrent dans la régulation de la machinerie de fission mitochondriale et la mitophagie.

Effet indirect de Parkine sur les voies de signalisation calcique activant Drp1

De notre travail, une première nouveauté émerge concernant l'effet de Parkine sur la protéine Drp1. Les différentes stratégies de manipulation pharmacologique et l'utilisation de la FRET nous permettent la discrimination de deux mécanismes d'interaction fonctionnelle entre Parkine et Drp1, indirect et direct.

L'effet des traitements appliqués, inhibant les différentes étapes de la déphosphorylation du résidu S637, ou favorisant la phosphorylation de Drp1, se manifeste sur les cellules sélectivement en présence de Parkine exogène et non sur les cellules contrôles. Par conséquent, une action facilitatrice de Parkine sur ces étapes est soupçonnée.

Le fait que non seulement l'inhibiteur de la Calcineurine FK506, mais aussi le W13 et l'EGTA inhibent l'effet profission de Parkine, indique que cet effet pourrait être la conséquence de la modulation de la signalisation calcique, plutôt que le reflet d'une interaction fonctionnelle directe de Parkine avec Drp1 ou la Calcineurine.

Parkine exerce son activité E3 ubiquitine-protéine ligase sur plusieurs substrats importants pour le maintien du 'cross-talk' entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, comme les mitofusines, Pael-R et la PLC γ (voir Chapitre 1, section V : mécanismes pathogénique au cours de la MP (Dehvari N *et al.*, 2009; Sandebring A *et al.*, 2009a; Gegg ME *et al.* 2010; Poole AC *et al.* 2010; Tanaka A *et al.* 2010; Ziviani E *et al.*, 2010; Glauser L *et al.*, 2011; Rakovic A *et al.*, 2011). Ces substrats affectent la régulation des réponses anti-stress mises en œuvre par le réticulum endoplasmique dans le cadre de la UPR. En modulant leurs niveaux, Parkine pourrait aussi avoir un impact sur la mobilisation des réserves de Ca²⁺ intracellulaire et sur les voies de signalisation calcique. L'effet de Parkine sur l'homéostasie calcique a été documenté : Sandebring et ses collaborateurs rapportent une augmentation de la concentration cytosolique de Ca²⁺ suite à la perte de fonction de la Parkine (Sandebring A *et al.*, 2009a) ; plus récemment Calì et ses collaborateurs observent que la surexpression de Parkine cause l'augmentation

des vagues calciques entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Calì T *et al.*, 2013). La généralisation de ces résultats à nos paradigmes expérimentaux n'est pas possible, compte tenu du fait que ces études ont été réalisées dans des modèles cellulaires différents, dans lesquels la Parkine et PINK1 se sont révélées affecter différemment la dynamique de fusion/fission du réseau mitochondrial que dans le modèle que nous avons employé. L'étude des mécanismes qui règlent l'homéostasie calcique en présence des différentes formes de Parkine, sauvage ou mutée, ainsi que la caractérisation de l'activité et des niveaux de la Calcineurine, de la Calmoduline et de la CaM kinase I α , représentent des possibles perspectives d'évolution de ce projet.

L'effet pro-fission de Parkine peut être au moins en partie indépendant de PINK1 et n'est pas requis pour la mitophagie

La deuxième nouveauté émergeant de notre travail concerne l'indépendance de Parkine de PINK1 vis-à-vis de sa capacité de promouvoir la fission mitochondriale dans des conditions basales.

Ainsi l'effet pro-fission de Parkine persiste en absence de PINK1 et les traitements pharmacologiques inhibent cet effet, que PINK1 soit présent ou non. De plus, cet effet ne semble pas essentiel à la mitophagie puisqu'il peut être compromis par une mutation pathogène, sans que cela ait un impact sur la dégradation mitochondriale en présence de CCCP.

Ces résultats nous ont fourni la première évidence que Parkine agit sur la dynamique mitochondriale par deux différents mécanismes : a) un mécanisme d'interaction indirecte avec Drp1 et indépendante de PINK1, ayant un impact additif sur b) un mécanisme mise en œuvre en coopération avec PINK1 dans le cadre de la mitophagie.

Parkine et PINK1 coopèrent dans le recrutement de Drp1 dans le contexte de la mitophagie

Un troisième point de discussion concerne l'interaction physique entre les protéines Parkine, Drp1 et PINK1, relevées par les expériences de FRET dans les conditions de base et amplifiées dans le contexte de la mitophagie.

Comme nous l'avons amplement expliqué dans la discussion de notre article, cela suggère une coordination spatiale et temporelle des recrutements de Parkine et Drp1 à proximité de PINK1, reconnue indispensable au cours de la mitophagie.

Des considérations additionnelles sont nécessaires à propos des effets observés en présence des mutants de Parkine qui révèlent que les deux effets sur la fission mitochondriale et la mitophagie sont indépendants. Les résultats obtenus par l'étude de la mitophagie en présence du variant G328E de Parkine, fournissent une clef pour comprendre que l'interaction Parkine/Drp1 règle le lieu et l'efficacité des processus de fission mitochondriale et de mitophagie.

La machinerie PINK1/Parkine est donc essentielle ayant fonction de plate-forme d'échafaudage pour la coordination spatio-temporelle entre Drp1 et la machinerie de l'autophagie.

Drp1 semble être l'acteur principal dans la coordination entre la fission mitochondriale et la mitophagie, réglée par la voie PINK1/Parkine ; un rôle similaire pour Drp1 a été d'autre part décrit pendant l'apoptose, lorsque la formation de foci de Drp1 est étroitement liée à l'accumulation mitochondriale de BAX, réglant ainsi la coordination entre l'apoptose et la fission (Karbowski M *et al.*, 2002).

En perspective, d'un point de vue de la physiologie mitochondriale, la relation entre les paramètres de la morphologie mitochondriale et ceux de la phosphorylation oxydative devra être prise en compte ; Liu et ses collaborateurs ont par exemple montré, dans un modèle de drosophile invalidé pour l'expression de *PINK1*, comment l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire peut être modifié suite à la surexpression de Drp1 (Liu W *et al.*, 2011). A cette fin, des clones cellulaires homogènes pour l'expression, stable ou inductible des protéines PINK1 et Parkine serait préférable au modèle COS7 d'expression transitoire.

D'autres aspects méritant un approfondissement sont i) la contribution des autres protéines actrices dans la fission mitochondriale et ii) les mécanismes additionnels de régulation de l'activité de Drp1 ; par exemple la phosphorylation du résidu S616 est un mécanisme corrélé à l'action de la CDK1 et donc au cycle de prolifération cellulaire.

Enfin, en perspective, il sera essentiel d'approfondir nos connaissances de ces mécanismes dans les neurones ; il est possible que dans ces cellules post-mitotiques le poids relatif de chacun de ces mécanismes et son impact dans les processus de fusion et de fission mitochondriale soit significativement différent par rapport à ce qui est observé dans des lignées cellulaires.

VIII.6 Article 2



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance

Q1 Lori Buhlman^{a,b,c,d,1}, Maria Damiano^{a,b,c,1}, Giulia Bertolin^{a,b,c}, Rosa Ferrando-Miguel^{a,b,c}, Anne Lombès^{e,f,g}, Alexis Brice^{a,b,c}, Olga Corti^{a,b,c,*}

^a Inserm, U 1127, ICM, Paris, F-75013 Paris, France

^b Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UM 75, F-75013 Paris, France

^c CNRS, UMR 7225, ICM, Paris, F-75013 Paris, France

^d Department of Biomedical Sciences, Midwestern University, 19555 N 59th Avenue, Glendale, Arizona 85308, United States

^e Inserm U 1016, Institut Cochin, F-75014, Paris, France

^f CNRS UMR 8104, F-75014 Paris, France

^g Université Paris 05, UMR_S1016 F-75014, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2014

Received in revised form 16 May 2014

Accepted 19 May 2014

Available online xxxx

Keywords:

PINK1/Parkin pathway

Mitochondrial dynamics

Calcium/calmodulin/calcineurin signaling

Mitochondrial clearance

Drp1

MiD51

ABSTRACT

Autosomal recessive early-onset Parkinson's disease is most often caused by mutations in the genes encoding the cytosolic E3 ubiquitin ligase Parkin and the mitochondrial serine/threonine kinase PINK1. Studies in *Drosophila* models and mammalian cells have demonstrated that these proteins regulate various aspects of mitochondrial physiology, including organelle transport, dynamics and turnover. How PINK1 and Parkin orchestrate these processes, and whether they always do so within a common pathway remain to be clarified. We have revisited the role of PINK1 and Parkin in mitochondrial dynamics, and explored its relation to the mitochondrial clearance program controlled by these proteins. We show that PINK1 and Parkin promote Drp1-dependent mitochondrial fission by mechanisms that are at least in part independent. Parkin-mediated mitochondrial fragmentation was abolished by treatments interfering with the calcium/calmodulin/calcineurin signaling pathway, suggesting that it requires dephosphorylation of serine 637 of Drp1. Parkinson's disease-causing mutations with differential impact on mitochondrial morphology and organelle degradation demonstrated that the pro-fission effect of Parkin is not required for efficient mitochondrial clearance. In contrast, the use of Förster energy transfer imaging microscopy revealed that Drp1 and Parkin are co-recruited to mitochondria in proximity of PINK1 following mitochondrial depolarization, indicating spatial coordination between these events in mitochondrial degradation. Our results also hint at a major role of the outer mitochondrial adaptor MiD51 in Drp1 recruitment and Parkin-dependent mitophagy. Altogether, our observations provide new insight into the mechanisms underlying the regulation of mitochondrial dynamics by Parkin and its relation to the mitochondrial clearance program mediated by the PINK1/Parkin pathway.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the most frequent movement disorder and the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. Nearly 10% of cases are caused by mutations in at least seven genes. Mutations in the *PARK2* (*parkin*) and *phosphotensin-induced putative kinase 1* (*PINK1*) genes, which encode a cytosolic E3 ubiquitin-protein ligase and a mitochondrial serine/threonine-protein kinase,

account for clinically similar autosomal recessive early-onset forms of the disease [1].

Genetic studies in *Drosophila* have demonstrated that *PARK2* functions downstream of *PINK1* in a common pathway that regulates mitochondrial morphology and dynamics [2–8]. Loss of *PARK2* and *PINK1* functions in this model cause mitochondrial defects that are suppressed by increased expression of the mitochondrial fission-promoting dynamin-related GTPase Drp1, or by downregulation of the fusion-promoting GTPases, Mitofusin (Mfn) and OPA1, suggesting that the *PINK1/PARK2* pathway promotes mitochondrial fission [5–8]. Studies in mammalian cells have complicated this view, providing evidence that this pathway regulates processes involved both in mitochondrial fusion and fission, with net outcomes on mitochondrial connectivity depending on the cell context and experimental conditions [7,9–16].

* Corresponding author at: Molecular basis, physiopathology and treatment of neurodegenerative diseases; Brain and Spine Institute, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France. Tel.: +33 15 72 74 651; fax: +33 15 72 74 795.

E-mail address: olga.corti@upmc.fr (O. Corti).

¹ These authors contributed equally to this work.

In mammalian cells, PINK1 and Parkin regulate a plethora of additional processes related to mitochondrial maintenance, including mitochondrial biogenesis, transport and calcium homeostasis [17–25]; whether they always act concertedly and within the limits of a shared pathway to preserve mitochondrial function and cell survival is unclear [26,27]. Notwithstanding, the cooperative role of these proteins in the degradation of dysfunctional mitochondria may be the main route by which they preserve mitochondrial quality. Loss of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_{mit}$) leads to PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria and subsequent ubiquitin-mediated proteasomal degradation of mitochondrial proteins and mitophagy [28–32]. This process is preceded by the dynamic mitochondrial remodeling, which isolates damaged organelles from the healthy network and detaches them from cytoskeletal elements [22,33]. The mechanisms underlying the spatiotemporal coordination of these events remain to be clarified.

We have explored changes in mitochondrial morphology triggered by the modulation of PINK1 and Parkin expression, and studied the consequences of these morphological changes on the mitochondrial degradation program promoted by these proteins. We report that Parkin can promote mitochondrial fission independently of PINK1 and that this effect depends on pathways involved in Drp1 phosphorylation. In addition, we provide evidence that loss of $\Delta\Psi_{mit}$ leads to recruitment of Drp1 to mitochondria in proximity of PINK1 and Parkin, suggesting that mitochondrial division occurs at sites where the PINK1/Parkin-dependent mitochondrial clearance program is initiated.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and transfection

Cos-7 cells were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Grand Island, NY), 1% L-glutamine (Invitrogen) and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen) at 37 °C, with 5% CO₂ and adequate humidity. The night before transfection, approximately 25,000 cells were plated on 14-mm glass coverslips (Fisher Scientific, Germany) in 24-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). For starvation, cells were maintained in Hank's balanced salt solution (HBSS) for 1 h.

Plasmids used for transfections were: pcDNA3-HA-Parkin (WT or G328E or R275W) [34], pCB6-HA-mitoGFP [34], pCB6-Myc-Drp1/Drp1 K38A [35], and pcDNA3-V5-His-TOPO (Invitrogen) with PINK1 cDNA as insert. For RNA interference experiments, the following siRNAs were used: a PINK1- or Parkin-specific stealth siRNA (Invitrogen), Mff- (Qiagen, Valencia, CA), MiD49 and MiD51-specific siRNAs (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) and a stealth universal negative control (Invitrogen). The cells were transfected with plasmids using DMR1E-C (Invitrogen) or with siRNAs and plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

2.2. Pharmacological agents

The protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP; Sigma, St. Louis, MO) was applied at 10 μ M for the indicated time periods. The specific calcineurin (CaN) inhibitor FK506 and the cAMP elevating agent Forskolin (Forsk) were obtained from Tocris Bioscience (Minneapolis, MN). The calmodulin (CaM) inhibitor W13 was from Calbiochem/Millipore (Billerica, MA). EGTA was purchased from Sigma-Aldrich. Concentrations and treatment times were as indicated.

2.3. Immunocytochemistry

Cells were fixed 48 or 72 h after transfection with 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) in DMEM for 15 min, rinsed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with 0.2% Triton

X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 10 min. Where indicated, prior to fixation, the cells were incubated with 500 nM MitoTracker Deep Red (Invitrogen). The cells were processed with standard immunocytochemical techniques, using primary polyclonal rabbit (anti-Parkin, 1:2000, Millipore; anti-PINK1, 1:2000, Abcam (Cambridge, MA); anti-PINK1, 1:2500, Novus Biologicals (Littleton, CO); anti-PMPCB, 1:1000, Dharmacon (Pittsburg, PA)), polyclonal goat (anti-VDAC2, 1:500, Abcam; anti-HSD17B10, 1:200, Abcam) or monoclonal mouse antibodies (anti-Dlp1, 1:2000, BD Biosciences (San Jose, CA); anti-p62, 1:5000, Abcam), and secondary anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat antibodies conjugated to Alexa 488 (1:1000 or 1:10000 for FRET analyses, Invitrogen), Alexa 350 (1:250, Invitrogen), Alexa 568 (1:10000, Invitrogen), Cy3 (1:1000, Sigma) or Cy5 (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Cells were mounted on glass microscope slides with ProlongGold mounting medium (Invitrogen).

2.4. Immunoblotting

For Western blot analyses, 125,000 cells were plated the night before transfection in six-well culture plates (Nunc). Forty-eight hours after transfection cells were incubated in lysis buffer containing 20 mM Hepes, 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 1% NP40, phosphatase inhibitors (0.2 mM Na₃VO₄, 1 mg/ml NaF, 5.4 mg/ml β -glycerophosphate) and protease inhibitors (Complete Cocktail, Roche), pH 7.0. Whole-cell lysates (50 μ g) were separated on a 10% denaturing polyacrylamide gel and electroblotted. The antibodies used for immunolabeling were: primary mouse monoclonal (anti-Dlp1, 1:2000, BD Biosciences; anti-PINK1, 1:500, Abgent (San Diego, CA); anti-actin, 1:2000, Abcam), polyclonal rabbit (anti- β -tubulin, 1:10,000, Abcam; anti-actin, 1:2000, Sigma-Aldrich; anti-phospho-Drp1 (S637), 1:1000, Cell Signaling (Danvers, MA); anti-Mff, 1:500, Abcam; anti-MiD51, 1:100, Santa Cruz Biotechnologies), polyclonal goat (anti-MiD49, 1:100, Santa Cruz Biotechnologies). Incubation with horseradish peroxidase-conjugated or fluorescent secondary anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat antibodies (1:50,000, Jackson ImmunoResearch; 1:10,000, Li-Cor) was followed by ECL detection of the signals (Pierce, Rockford, IL) or capture with the Odyssey Imaging (Li-Cor, Lincoln, NE) system.

2.5. Epifluorescence and confocal microscopy

Fluorescence images were captured using Zeiss Axioplan 2 imaging fluorescence microscope (Zeiss, Germany) in conjunction with Explora Nova Fluo'Up image-capturing software (Explora Nova, La Rochelle, France).

Cells were categorized according to mitochondrial network morphology or lack of VDAC1 immunostaining with a 63 \times oil objective (N.A. 1.40). Mitochondrial network morphologies were classified as: tubular (category 1); truncated (category 2); fragmented (category 3); and aggregated (category 4, in cells treated with CCCP). One hundred to 500 cells overproducing each protein of interest were scored from two to four independent wells per condition in each experiment.

Quantitative analysis of the mitochondrial network morphology, visualized with MitoTracker or mtGFP, was performed on 15–30 pictures of cells overproducing the proteins of interest taken with a 63 \times oil objective using ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland), as described [36,37]. Aspect ratio is the ratio between major and minor axes of each mitochondrial object, and thus represents its length. Form factor is calculated as $\text{perimeter}^2/(4\pi \times \text{area})$ and thus represents a combined evaluation of the length and degree of branching of the mitochondrial network.

For FRET analyses, images of donor and acceptor fluorescence were acquired before and after photobleaching from 10 to 20 cells per condition, in each of three independent experiments, with the 63 \times oil objective. A region of interest was drawn with Leica Confocal Software on randomly chosen areas of acceptor fluorescence and photobleached with a 543 nm Helium Neon laser for 20 ms. Fluorescence of the

190 donor was corrected for the decrease in fluorescence intensity due
191 to the acquisition process with ImageJ. Donor (D) fluorescence (F)
192 intensities (I) were quantified with ImageJ and FRET efficiencies were
193 determined as follows: % FRET = $(I_D \text{ postbleach} - I_D \text{ prebleach})/I_D$
194 postbleach [38,39].

195 2.6. Statistical analyses

196 One-way ANOVA followed by Holm–Sidak or Dunn's multiple
197 pairwise comparisons was used to compare the effect of Drp1 variants
198 within “Parkin” or “PINK1” conditions (Fig. 2), or to compare FRET effi-
199 ciencies between groups in Fig. 8D. One-way ANOVA on ranks and the
200 Kruskal–Wallis multiple comparison procedure was used to analyze
201 FRET efficiencies in Figs. 8E, 9B and 10C–D, and the relative abundance
202 of Drp1 in Fig. 10B. Two-way ANOVA and the Holm–Sidak multiple
203 pairwise comparison procedure were used to analyze time-dependent
204 differences between groups in Figs. 1, 5A, 6B and D, 7A–D and effect of
205 treatments between groups in Figs. 4C, D, 5C, 7D and 10E.

206 3. Results

207 3.1. Changes in mitochondrial morphology caused by Parkin and PINK1 are 208 mediated by Drp1

209 To explore the effects of PINK1 and Parkin on mitochondrial
210 morphology, we used a simian kidney fibroblast cell line (COS7),
211 which is well suited for this purpose because of its large cytoplasm

and well-developed mitochondrial network. Classification of cells
212 according to mitochondrial network morphology showed a significant
213 increase in the proportion of cells with fragmented mitochondria
214 associated with Parkin overproduction (Fig. 1A and B, C, upper graphs).
215 Quantitative image analysis of mitochondrial morphology in individual
216 cells revealed a modest but reproducible reduction in the complexity of
217 the mitochondrial network compatible with mitochondrial fragmenta-
218 tion in cells overproducing PINK1 or Parkin (Fig. 1B and C, middle and
219 lower graphs).

220 When overproduced, Drp1 was found throughout the cytosol with
221 a filamentous distribution, whereas its dominant negative, GTPase inac-
222 tive variant, Drp1 K38A, formed cytosolic aggregates (Fig. 2A). Exoge-
223 nous Drp1 was associated with a reduction in the aspect ratio but not
224 the form factor of mitochondrial structures in control cells, and it did
225 not exacerbate the effects of PINK1 and Parkin (Fig. 2A and B). Exoge-
226 nous Drp1 K38A did not affect mitochondrial morphology per se; how-
227 ever, it significantly mitigated the mitochondrial fragmentation induced
228 by PINK1 and Parkin (Fig. 2B).

230 3.2. Changes in mitochondrial morphology promoted by Parkin depend on 231 the phosphorylation status of Drp1 and can occur independently of PINK1

232 Phosphorylation of serine 637 in the GTPase effector domain of
233 Drp1 isoform 1 inhibits mitochondrial fission; S637 phosphorylation is
234 regulated by the antagonistic effects of protein kinase A (PKA) and the
235 calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin (CaN) [40]
236 (Fig. 3A). Conversely, phosphorylation of serine 600 of Drp1 isoform 3

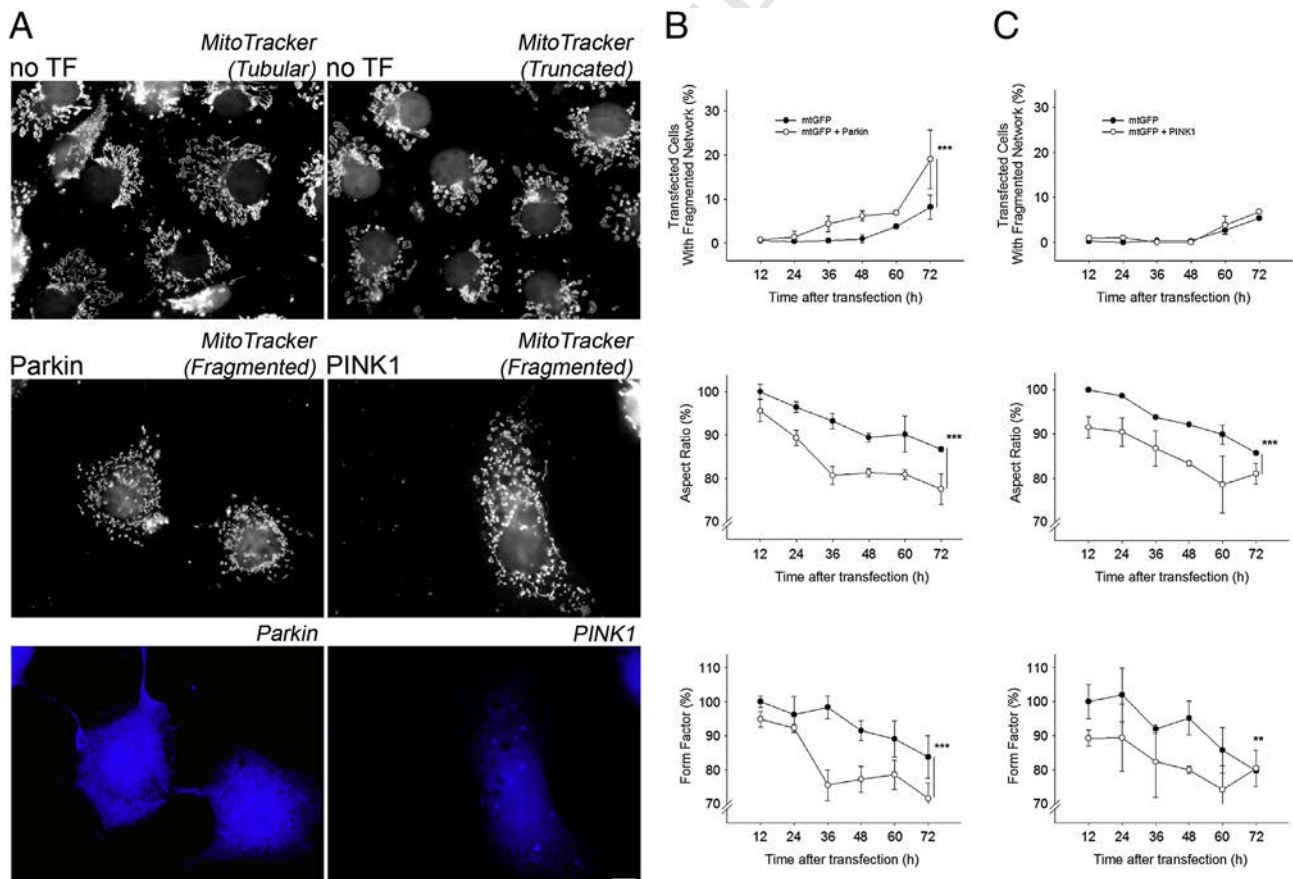


Fig. 1. The PINK1/Parkin pathway promotes mitochondrial fragmentation in COS7 cells. (A) Categorization of cells according to their mitochondrial network, visualized by Mitotracker Deep Red: category 1 = tubular, category 2 = truncated, category 3 = fragmented; no TF: no transfection, Parkin/PINK1: transfection with expression vectors encoding Parkin or PINK1 (blue staining). Scale bar: 10 μ m. (B and C) Proportion of cells with fragmented mitochondrial networks (upper panels) and analysis of mitochondrial network morphology (middle and lower panels) using the two descriptive parameters, aspect ratio (AR) and form factor (FF) ([36,37] and Section 2), expressed as percentage of the mtGFP control, at different time points after transfection of the cells with the indicated expression vectors; in this case, mitochondrial networks were visualized by mtGFP. Results from two independent experiments performed in duplicate. Error bars represent SEM (* p -value < 0.05; ** p -value < 0.02; *** p -value < 0.01).

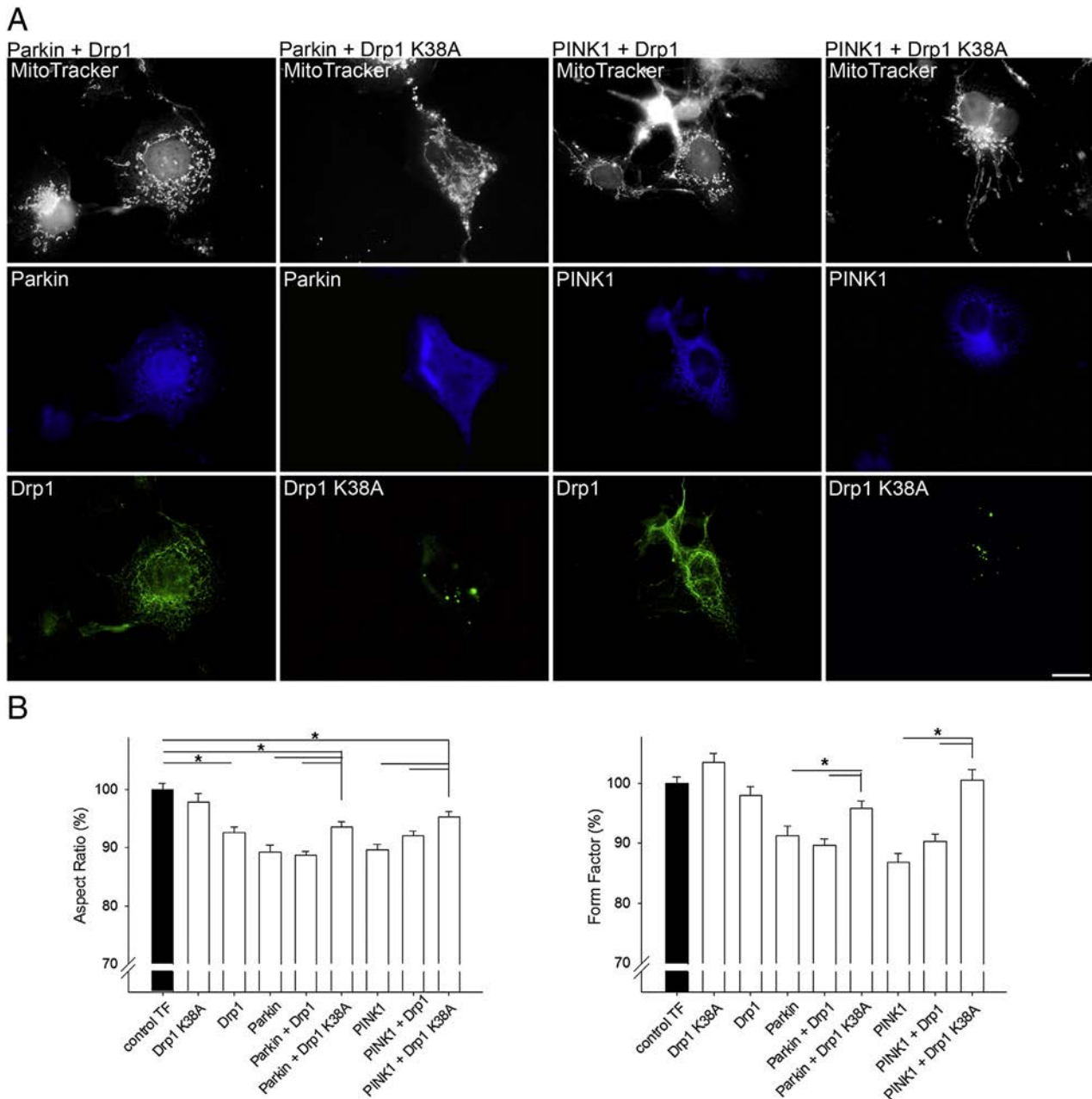


Fig. 2. Drp1 mediates the pro-fission effects of Parkin and PINK1. (A) Subcellular distribution of exogenous Drp1 or Drp1 K38A and their effects on the morphology of the mitochondrial network, visualized by MitoTracker in cells overproducing Parkin or PINK1. (B) Quantification of mitochondrial morphology in cells overproducing PINK1, Parkin, Drp1 or Drp1 K38A alone or in the indicated combinations (AR and FF values are expressed as percentages of Control TF). Control TF: cells transfected with a non-coding vector. Results represent at least three independent experiments performed in duplicate. Error bars represent SEM (* p -value < 0.05).

(which corresponds to serine 637 of isoform 1) is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I α and promotes mitochondrial fragmentation [41]. To investigate the role of the phosphorylation status of Drp1 in the modification of mitochondrial morphology by Parkin, we analyzed the effect of FK506, a specific calcineurin inhibitor; forskolin, an adenyl cyclase activator; W13, an inhibitor of the upstream CaN activator calmodulin; or EGTA, a calcium chelator (Fig. 3A). We observed that FK506, forskolin and EGTA treatment led to a significant increase in the abundance of the pool of Drp1 phosphorylated on serine 637; a similar, although more moderate effect, was observed in cells treated with W13 (Fig. 3B). These treatments prevented the mitochondrial fragmentation triggered by exogenous Parkin without overtly perturbing

the appearance of the mitochondrial network in control cells (mtGFP, 249 Fig. 4A–C). In contrast, starvation resulted in mitochondrial elongation, 250 as previously reported [42,43], demonstrating the reliability of the 251 methodologies used here to characterize mitochondrial morphology 252 (Supplementary Fig. 1). 253

Silencing of the endogenous *PINK1* gene by RNA interference led to 254 mitochondrial elongation in control cells (Fig. 5A, B), whereas overpro- 255 duction of PINK1 resulted in mitochondrial fragmentation (Fig. 1C). 256 After PINK1 depletion, the morphology of the mitochondrial network 257 in cells overproducing Parkin was similar to that of control cells (endog- 258 enous Parkin and PINK1 levels); however, the network remained more 259 fragmented than in control cells depleted for *PINK1*, indicating that the 260

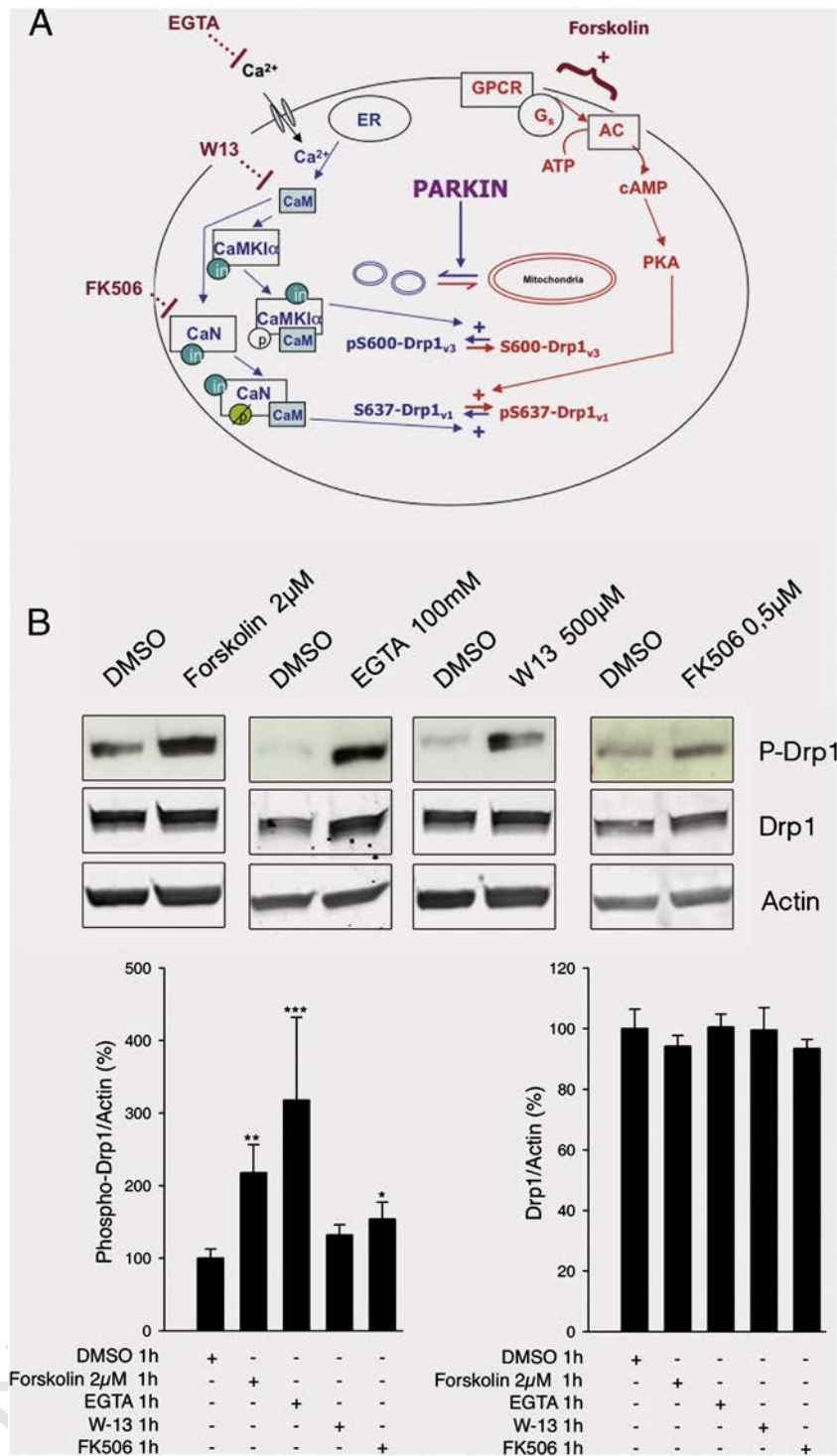


Fig. 3. The phosphorylation status of Drp1 is modulated by signaling pathways that can be targeted by pharmacological agents. (A) Diagram illustrates the key steps of the calcium/calmodulin (CaM)/calcineurin (CaN), cAMP/PKA and CaM kinase α -dependent pathways regulating phosphorylation of Drp1 isoform 1 on S637 (S637-Drp1_{v1}) or of Drp1 isoform 3 on S600 (S600-Drp1_{v3}), and effects of pharmacological agents. Pathways promoting mitochondrial fission are in blue and pathways inhibiting mitochondrial fission are in red. ER = endoplasmic reticulum; in = autoinhibitory domain; c = catalytic site of CaN or CaMKI α liberated by interaction with CaM; GPCR = G protein-coupled receptor; G_s = stimulatory G protein; AC = adenylate cyclase; cAMP = cyclic AMP; PKA = protein kinase A. (B) Western blot analysis and corresponding quantifications illustrating the effect of the indicated treatments on the abundance of S637-Drp1_{v1} (left graph) and total Drp1 (right graph) pools.

261 pro-fission effect of Parkin is at least in part preserved (Fig. 5A). In contrast, the effect of exogenous Parkin was inhibited by the calcineurin inhibitor FK 506, whether or not PINK1 was present, supporting a role of the phosphorylation status of Drp1 in the modulation of mitochondrial morphology by Parkin (Fig. 5B, C).

3.3. Drp1 facilitates Parkin-mediated degradation of dysfunctional mitochondria

The protonophore CCCP inhibits mitochondrial fusion in the short term [34,44,45], whereas in the long term it triggers PINK1/Parkin-

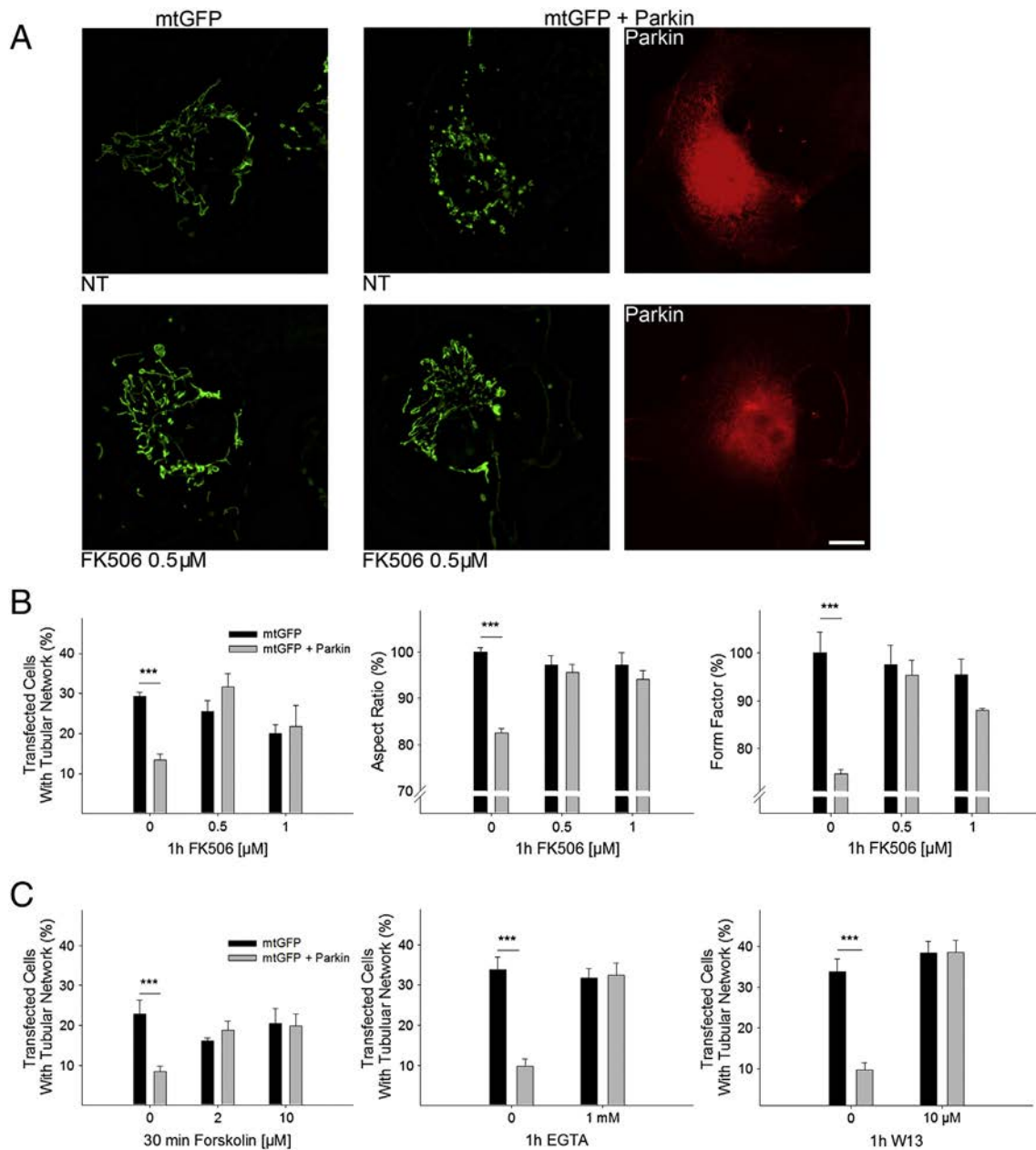


Fig. 4. Parkin-mediated mitochondrial fission depends on the phosphorylation status of Drp1. (A) Representative images depict the effect of CaN inhibitor FK506 (1 h of treatment) on mitochondrial morphology in control cells (mtGFP) or in cells overproducing Parkin (mtGFP + Parkin); NT: not treated; scale bar: 10 μ m. (B) Percentage of transfected cells with tubular mitochondrial network is visualized by mtGFP (left graph), and mitochondrial network morphology as a percent of control: (untreated mtGFP) in individual cells treated as indicated (middle and right graphs). (C) Percentage of transfected cells with tubular mitochondrial network, visualized by mtGFP, following treatment with the indicated drugs. Results are collected from three independent experiments. Error bars represent SEM (***p*-value < 0.01).

270 dependent mitochondrial clearance [28,30–32]. As expected, both in
 271 the presence and absence of Parkin, CCCP treatment led to progressive
 272 mitochondrial fragmentation; this effect was dependent on Drp1, as it
 273 was significantly mitigated by Drp1 K38A (Fig. 6A). In the presence of
 274 Parkin, mitochondrial fragmentation was rapidly followed by mito-
 275 chondrial aggregation and recruitment of the autophagy marker p62/
 276 SQSTM1. These processes were not affected by Drp1 K38A (Fig. 6A, B).

277 In a significant proportion of the cells overproducing Parkin, long-
 278 term treatment with CCCP led to clearance of the entire mitochondrial
 279 network, as illustrated by the disappearance of the mitochondrial
 280 matrix marker HSD17B10 [39], Drp1 K38A significantly delayed but
 281 did not prevent Parkin-dependent mitochondrial degradation (Fig. 6C,
 282 Supplementary Fig. 2).

3.4. Parkin-mediated fission is not required for clearance of dysfunctional mitochondria

285 Previous studies have shown that PD-causing *PARK2* mutations may
 286 differently affect CCCP-induced mitochondrial clearance. For example,
 287 the R275W substitution compromises the ability of Parkin to promote
 288 mitophagy, while G328E sustains this process [31,32] (Fig. 7D). These
 289 substitutions preserve the typical intracellular distribution of Parkin
 290 without forming aggregates or overtly perturbing the mitochondrial
 291 network ([35] and data not shown). Both substitutions modestly but
 292 significantly reduced the ability of Parkin to promote mitochondrial
 293 fragmentation under basal conditions (Fig. 7A). Mitochondrial mor-
 294 phology was similar in control cells and in cells overproducing Parkin

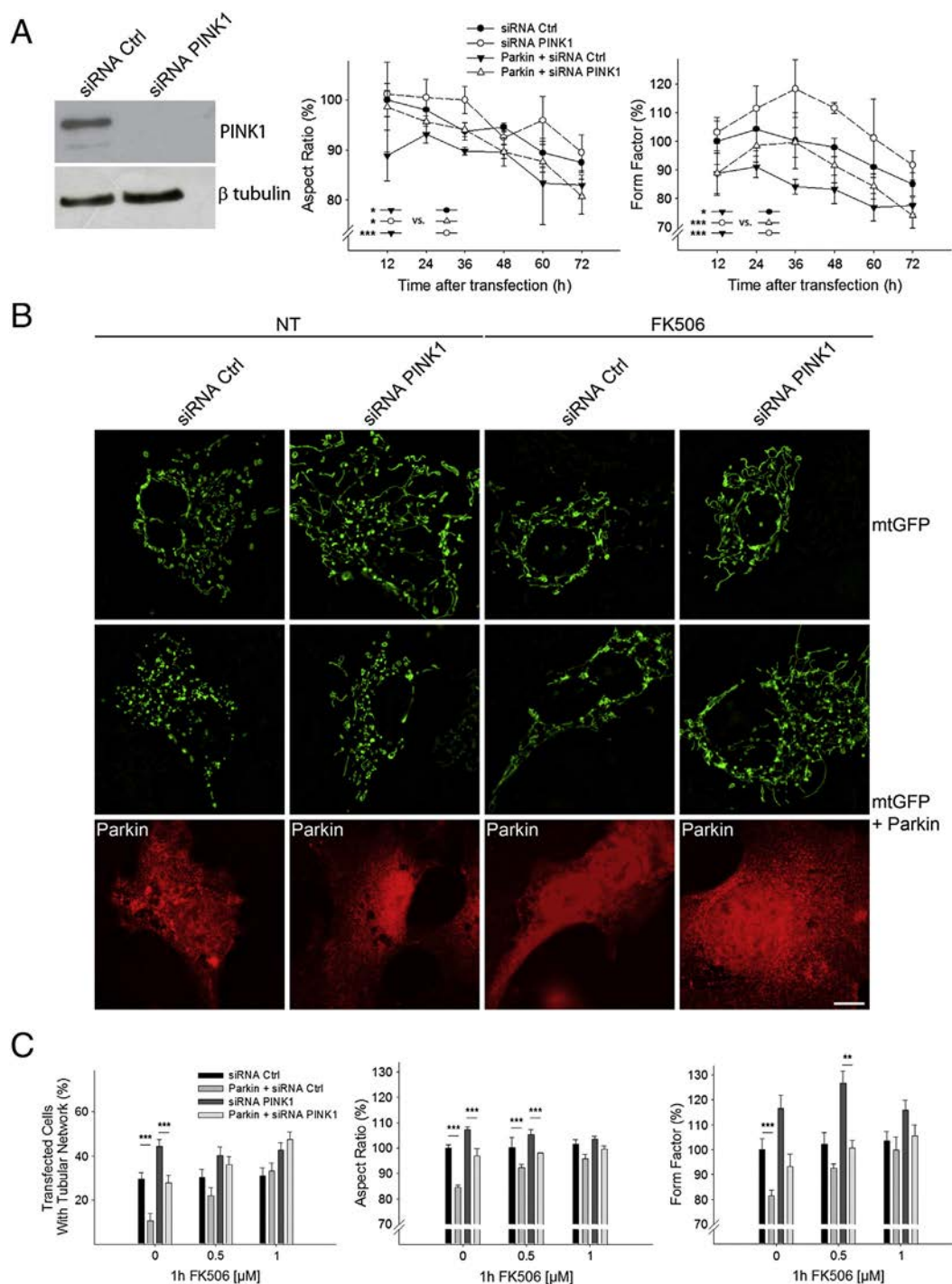


Fig. 5. Parkin promotes mitochondrial fission independently of PINK1. (A) Left panel: Western blot showing the efficiency of the PINK1 knockdown strategy; middle and right panels: changes in mitochondrial network morphology following siRNA-mediated PINK1 depletion in cells overproducing Parkin or in control cells at different time points after transfection (percentage of siRNA Ctrl, 12 h). (B) Representative images illustrate the effect of PINK1 depletion on changes in mitochondrial network morphology triggered by Parkin in cells treated or not (NT) with FK506 (0.5 μ M) for 1 h (scale bar: 10 μ m.), and (C) corresponding quantifications. Results represent three independent experiments. Error bars represent SEM (**p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.02; ****p*-value < 0.01).

295 R275W or Parkin G328E. However, in cells overproducing Parkin
296 R275W, the complexity of the mitochondrial network was also similar
297 to that of cells producing normal Parkin, indicating that, in contrast to
298 G328E, this substitution partially preserves the fission-facilitating effect
299 of Parkin. The R275W and G328E substitutions also attenuated the
300 ability of Parkin to promote mitochondrial fragmentation after
301 CCCP treatment: although the effect was weak, the mitochondrial
302 network appeared less fragmented in cells overproducing Parkin
303 R275W or Parkin G328E than in those producing normal Parkin

throughout the duration of the experiment (Fig. 7B, C). The kinetics
of mitochondrial aggregation and the efficiency of mitochondrial
clearance were similar for normal Parkin and Parkin G328E. In con-
trast, mitochondrial aggregation was delayed and mitochondrial
clearance compromised in cells producing Parkin R275W (Fig. 7D,
E). These results suggest that the modifications in mitochondrial
network morphology promoted by Parkin under basal conditions
are dissociated from the role of the protein in mitochondrial
clearance.

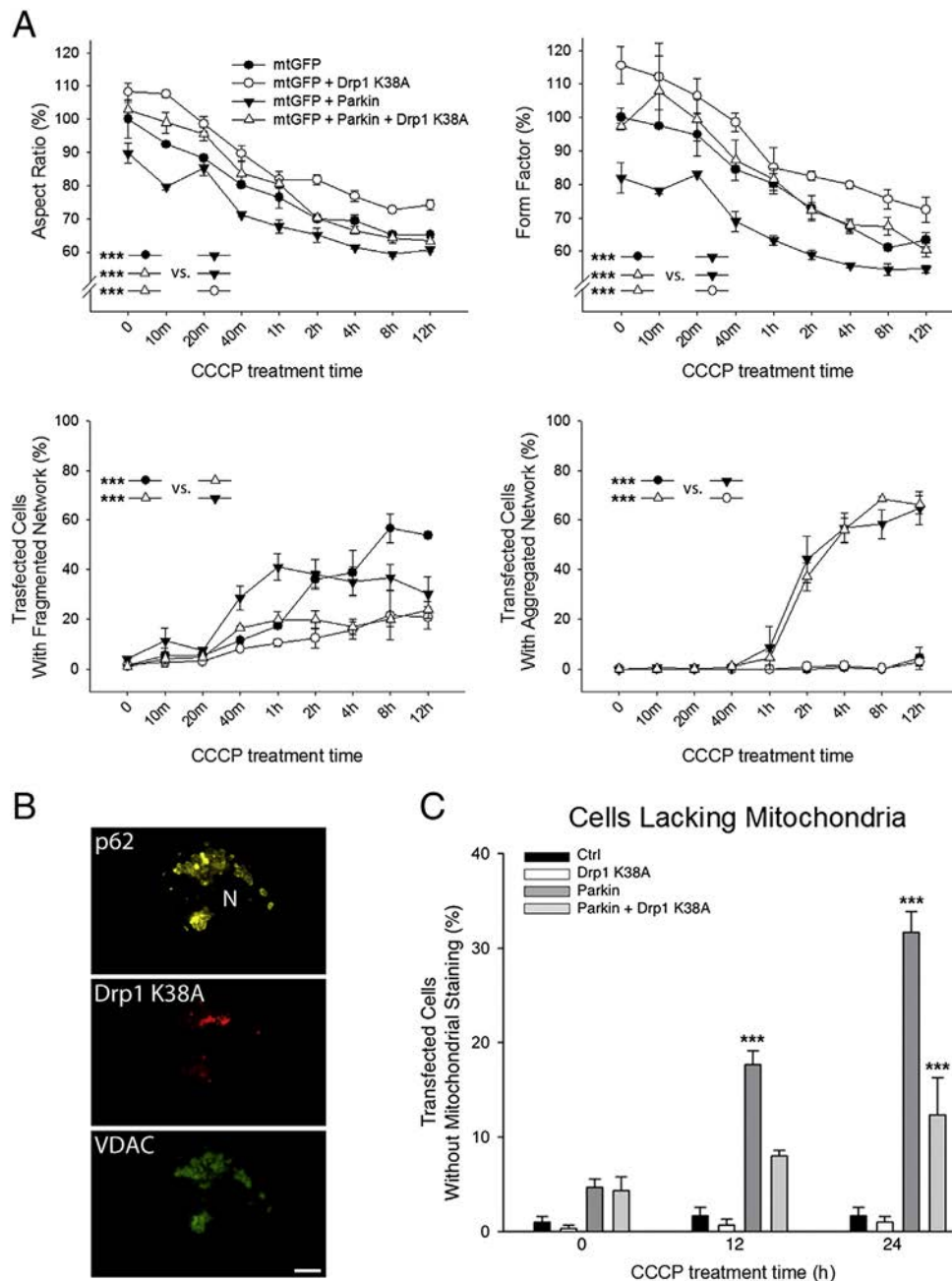


Fig. 6. The effects of Parkin on mitochondrial fission, aggregation and mitophagy are differentially affected by loss of Drp1 activity. (A) Time-dependent effects of CCCP treatment on mitochondrial morphology in cells overproducing mtGFP, Parkin or Drp1 K38A, alone or in the indicated combinations. Upper graphs: mitochondrial morphology in individual cells; lower graphs: proportion of cells with fragmented or aggregated mitochondria. Results from four independent experiments performed in duplicate. (B) Autophagy marker p62/SQSTM1 is recruited to aggregated mitochondria (stained for VDAC1), in cells overproducing Drp1 K38A and Parkin (not shown), after 6 h of treatment with CCCP. N: nucleus. Scale bar: 10 μm. (C) Progressive loss of mitochondria is evaluated by quantifying the number of cells lacking matrix marker HSD17B10 in cells overproducing Drp1 K38A and Parkin, alone or in association, after CCCP treatment. Results represent four independent wells of one representative experiment. Ctrl: control cells transfected with an empty vector. Error bars represent SEM (***)*p*-value < 0.01.

313 3.5. Parkin and Drp1 are co-recruited to mitochondria in proximity of
314 PINK1 upon induction of mitochondrial clearance

315 Drp1-dependent mitochondrial fission and the recruitment of
316 Parkin by PINK1 to the outer mitochondrial membrane are essential
317 for effective mitochondrial clearance [33]. We addressed the possibility
318 that these events are spatially coordinated by exploring molecular prox-
319 imities between Drp1, Parkin and PINK1 using Förster resonance energy
320 transfer (FRET) microscopy. FRET microscopy is a powerful technique to
321 detect transient, localized protein–protein interactions in cellulo,
322 detecting proximity between proteins at a distance of less than 10 nm

[38]. We recently used a FRET approach based on the detection of
323 quenched donor fluorescence after photobleaching of the acceptor,
324 with donor/acceptor protein pairs labeled with appropriate secondary
325 antibodies, to demonstrate that Parkin associates with PINK1 in proxim-
326 ity of the translocase of the outer mitochondrial membrane under
327 conditions of mitochondrial import impairment [39].
328

Under basal conditions, FRET was observed between Drp1
329 (endogenous or exogenous) and Parkin in mitochondria-rich regions
330 (Fig. 8A, D). CCCP treatment induced a significant increase in FRET effi-
331 ciency between these proteins in mitochondrial aggregates (Fig. 8B, D).
332 FRET was only detected after CCCP treatment between Parkin G328E
333

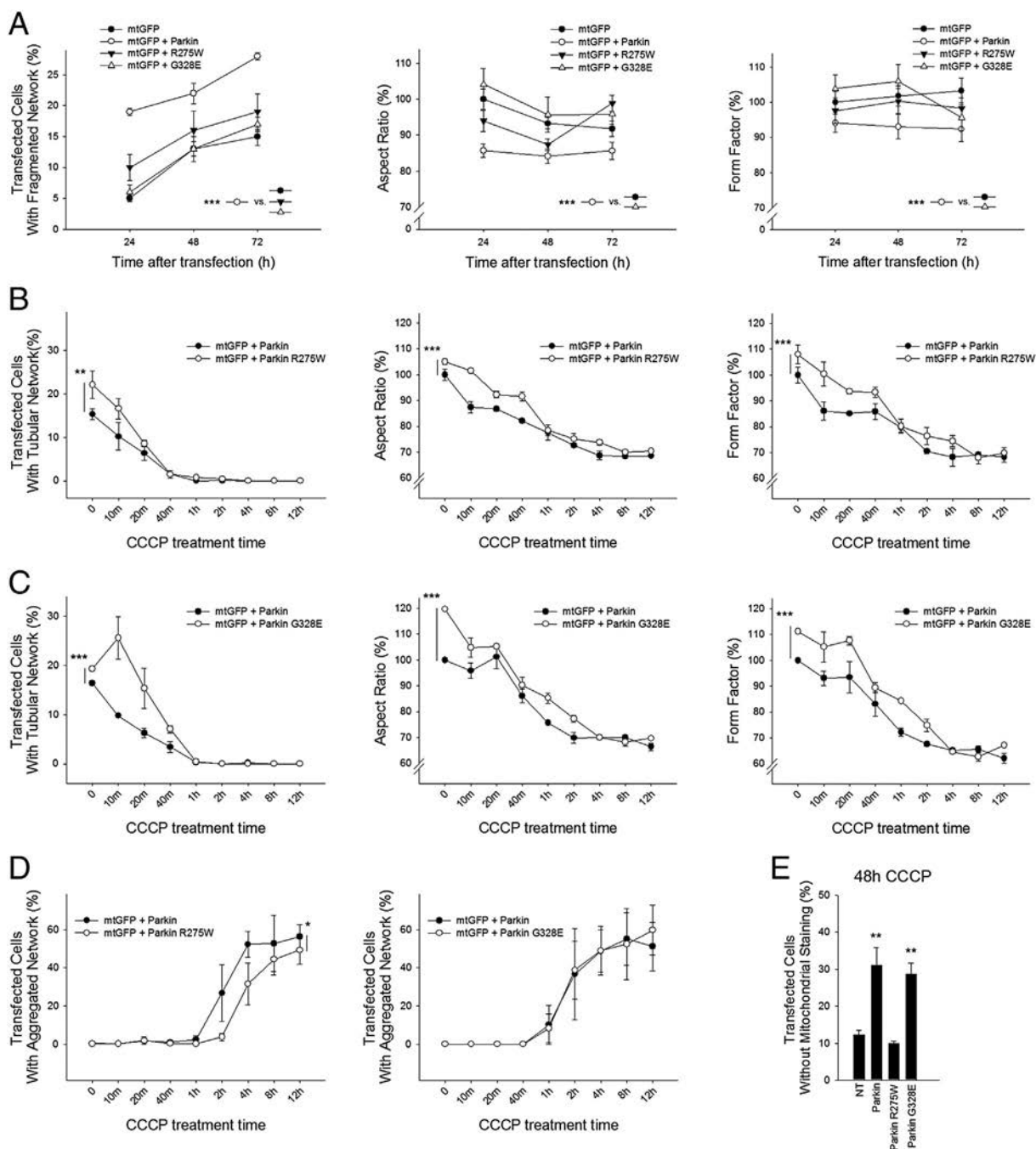


Fig. 7. PD-causing *PARK2* mutations differentially affect mitochondrial morphology and clearance. (A) The PD-causing amino acid substitutions R275W and G328E attenuate the ability of Parkin to promote mitochondrial fission, as revealed under basal conditions by the analyses of the proportion of cells with fragmented network, or of mitochondrial network morphology (expressed as percentage of mtGFP control, 24 h) at different time points after transfection. (B, C) Similar analyses confirm the mitochondrial fission-attenuating effect of the R275W and G328E substitutions throughout the duration of CCCP treatment. These substitutions have differential impact on Parkin-dependent mitochondrial aggregation (D) or mitochondrial clearance (E), evaluated as the proportion of transfected cells lacking mitochondrial staining (VDAC1) after CCCP treatment. Control TF: cells transfected with a non-coding vector. Results from three independent experiments (A), from two independent experiments performed in duplicate (B–D) or from one experiment representative of at least three (E). Error bars represent SEM. Comparisons are versus control TF in (E) (**p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.02; ****p*-value < 0.01).

334 and Drp1, and it was not detected between Parkin R275W in the presence or absence of CCCP (Fig. 8C, D). FRET was not observed between
335
336 VDAC1 and Parkin, a control donor/acceptor pair (Fig. 8D) [39].

337 *PINK1* silencing abolished FRET between Drp1 and Parkin under
338 basal conditions and lowered it significantly after CCCP treatment,
339 suggesting that these proteins are co-recruited on mitochondria in
340 proximity of *PINK1* (Fig. 8E). Consistent with this possibility, FRET was
341 also detected between endogenous *PINK1* and Drp1. This interaction

was enhanced following CCCP treatment, possibly due to the expected
342 stabilization of *PINK1* on the outer mitochondrial membrane, resulting
343 in greater abundance of donor molecules available for FRET (Fig. 9A,
344 B). FRET efficiency between *PINK1* and Drp1 was also enhanced follow-
345 ing overproduction of Parkin or Parkin G328E; in contrast, it was not
346 modified by Parkin R275W. Depletion of Parkin by RNA interference
347 abolished FRET between *PINK1* and Drp1, indicating that Parkin is
348 essential for recruitment of Drp1 in proximity of *PINK1* (Fig. 9C).
349

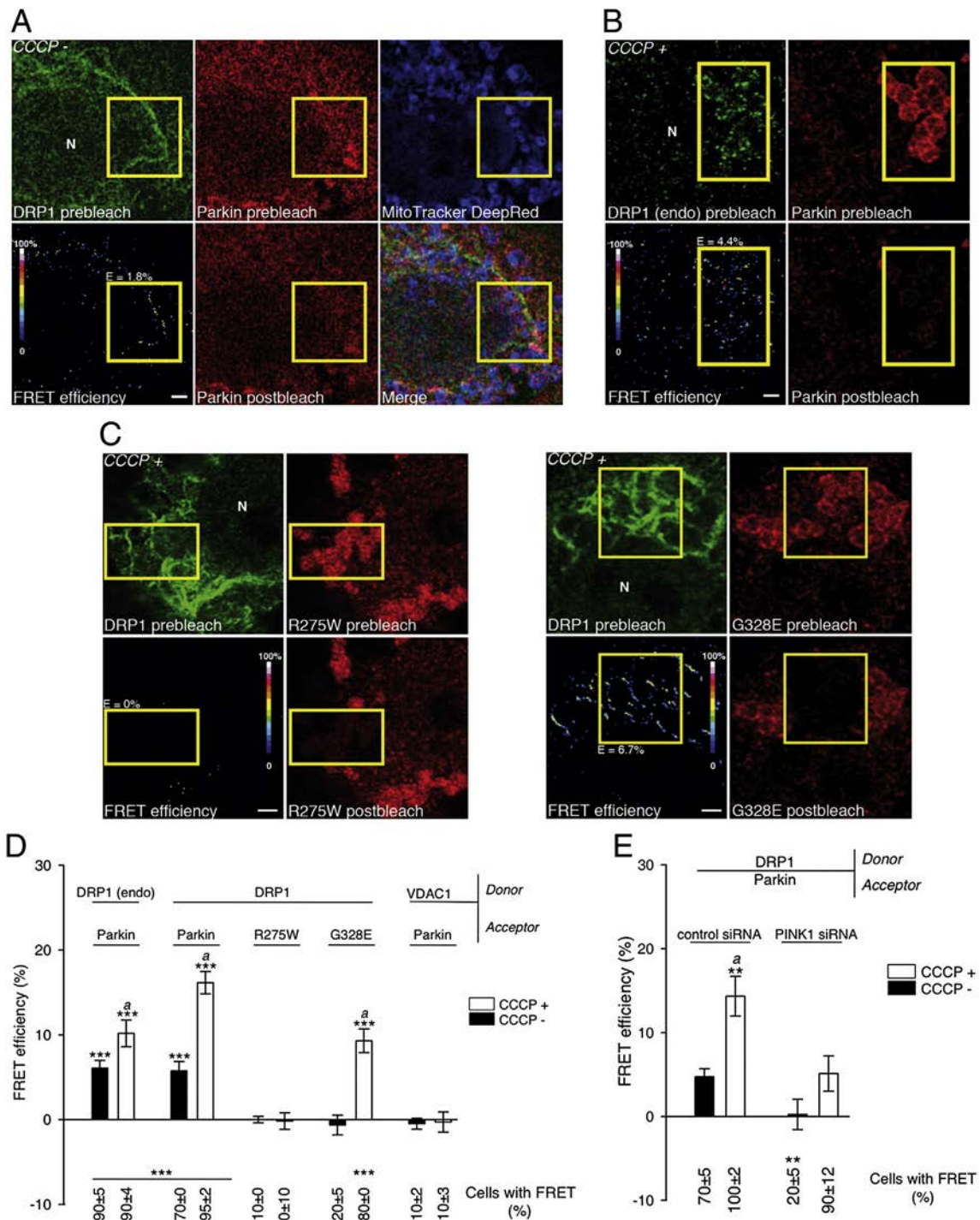


Fig. 8. Drp1 and Parkin associate upon induction of mitochondrial clearance in a PINK1-dependent manner. (A) Representative FRET images for exogenous Drp1 (green, donor) and Parkin (red, acceptor) in untreated COS7 cells. FRET efficiencies illustrate the increase in donor fluorescence in individual pixels after photobleaching of the acceptor, represented using a pseudocolor scale. Mitochondria (pseudocolored in blue) were labeled with Mitotracker DeepRed. E: mean FRET efficiency within the region of interest (yellow frame). N: nucleus. (B, C) Representative FRET images acquired from COS7 cells treated with CCCP for 6 h and (B) stained for endogenous Drp1 and overproducing Parkin or (C) co-overproducing Drp1 and Parkin R275W or Parkin G328E. (D, E) Quantitative FRET analysis for the indicated donor/acceptor pairs in COS7 cells treated or not with CCCP for 6 h and transfected with plasmids encoding the indicated Parkin variants (D) or with the indicated siRNAs (E). Percentages of COS7 cells displaying FRET are indicated below the histograms. $n = 10$ cells from one experiment representative of three. Data are means \pm SEM (** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 versus “CCCP–” or “CCCP+” condition of VDAC1/Parkin pair (D) or Drp1/Parkin pair in “PINK1 siRNA” condition (E)); * p -value < 0.01 versus the corresponding “CCCP–” condition. Scale bar: 10 μ m.

3.6. Mff, MiD49 and MiD51 mediate recruitment of Drp1 in proximity of Parkin and PINK1 upon induction of mitochondrial clearance

Several integral proteins of the outer mitochondrial membrane have been proposed to act as receptors or adaptors for the recruitment of

Drp1 to the mitochondrial surface [46–50], including mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa (MiD49 and MiD51) [49,50]. We investigated the potential role of these proteins in the association of Drp1 in proximity of PINK1 and Parkin and in Parkin-dependent mitophagy in cells treated with CCCP.

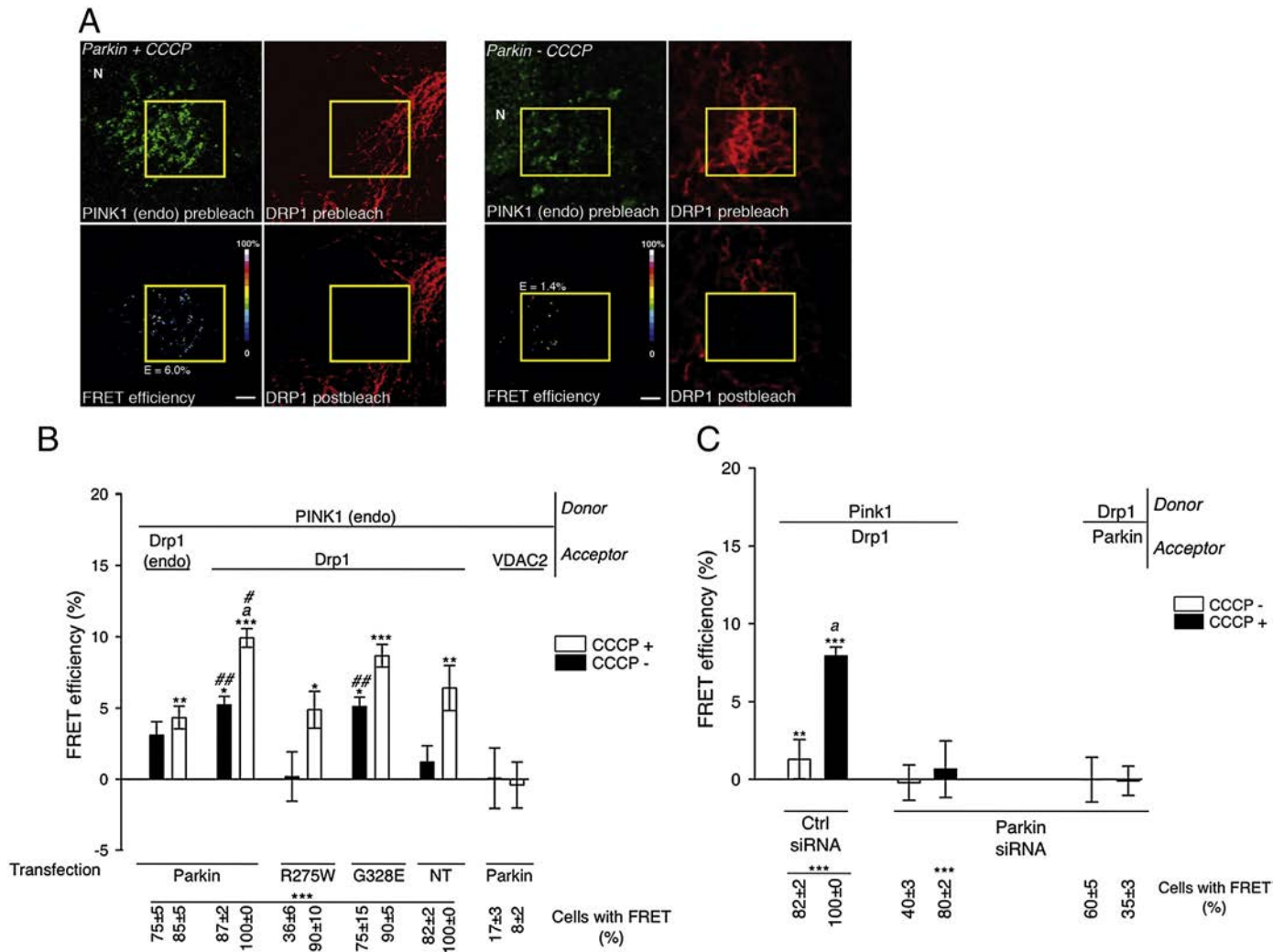


Fig. 9. Drp1 is recruited in proximity of PINK1 in a Parkin-dependent manner. (A) Representative FRET images for the PINK1 (endogenous)/Drp1 (exogenous) donor/acceptor pair in COS7 cells transfected with Parkin and treated or not with CCCP for 6 h. (B, C) Mean FRET efficiencies and percentages of cells displaying FRET for the indicated donor/acceptor pairs in COS7 cells treated or not with CCCP for 6 h. $n = 10$ cells from one experiment representative of three. Data are means \pm SEM (*p -value < 0.05 , $^{**}p$ -value < 0.01 , $^{***}p$ -value < 0.001 versus “CCCP–” or “CCCP+” condition of PINK1/VDAC2 pair (B) or Drp1/Parkin pair (C); $^a p$ -value < 0.001 versus the corresponding “CCCP–” condition (B, C); and $^{\#}p$ -value < 0.05 , $^{\#\#}p$ -value < 0.01 versus “CCCP–” or “CCCP+” of control condition (NT: cells transfected with a non-coding vector) in (B). Scale bar: 10 μ m.

359 To this end, FRET microscopy was used to explore the interaction
 360 between Parkin and Drp1 or PINK1 and Drp1 when Mid49 or
 361 Mid51 expression was reduced by RNA interference. Remarkably,
 362 downregulation of Mid49 or Mid51 led to a dramatic decrease in
 363 Drp1 levels in COS7 cells (Fig. 10A, B). In cells in which Drp1 was still
 364 visible, depletion of either proteins abolished FRET between the Drp1/
 365 Parkin and the PINK1/Drp1 pairs (Fig. 10C). Downregulation of Mff
 366 did not affect Drp1 levels but resulted in loss of FRET for both donor/
 367 acceptor pairs (Fig. 10A–C). To explore the functional significance of
 368 these observations, we analyzed the consequence of the depletion of
 369 Mff, Mid49 or Mid51 on mitochondrial fission and Parkin-dependent
 370 clearance triggered by CCCP. Depletion of Mid49 and Mid51 but not
 371 Mff attenuated mitochondrial fragmentation (Fig. 10D) and mitochon-
 372 drial clearance after 24 h of CCCP treatment (Fig. 10E). Downregulation
 373 of Mid49 led to a nearly 50% reduction in the proportion of cells without
 374 mitochondrial staining, an effect comparable to that of Drp1K38A
 375 (Fig. 5C). Remarkably, downregulation of Mid51 suppressed Parkin-
 376 dependent mitochondrial loss. These observations support a role of
 377 Mid49 or Mid51 in Drp1 recruitment and mitochondrial fission prior
 378 to mitophagy.

4. Discussion

379

We have revisited the roles of Parkin and PINK1 in mitochondrial re-
 modeling and investigated their relation to the mitochondrial degrada-
 tion program. In the cell model examined, the manipulation of Parkin
 and PINK1 expression levels was consistent with a pro-fission effect of
 these proteins; these observations are not only in line with findings in
Drosophila models, but also with more recent observations in primary
 hippocampal and dopaminergic neurons [4–6,8,15]. As previously
 reported, Parkin and PINK1 promoted changes in mitochondrial mor-
 phology via the dynamin-like GTPase Drp1 [11,13–15]; interestingly,
 we show that Parkin does so, at least in part, independently of PINK1,
 corroborating other studies suggesting that PINK1 and Parkin do not
 always act concertedly and may have independent functions in the
 regulation of mitochondrial activity and cell survival [26,27,51,52].

PINK1 had a more moderate impact on mitochondrial morphology
 than Parkin in overexpression studies. It has been previously reported
 that overproduction of PINK1 recruits Parkin to mitochondria, trigger-
 ing mitochondrial clearance in the absence of mitochondrial depolariza-
 tion [32,53]. Therefore, PINK1-mediated changes in mitochondrial

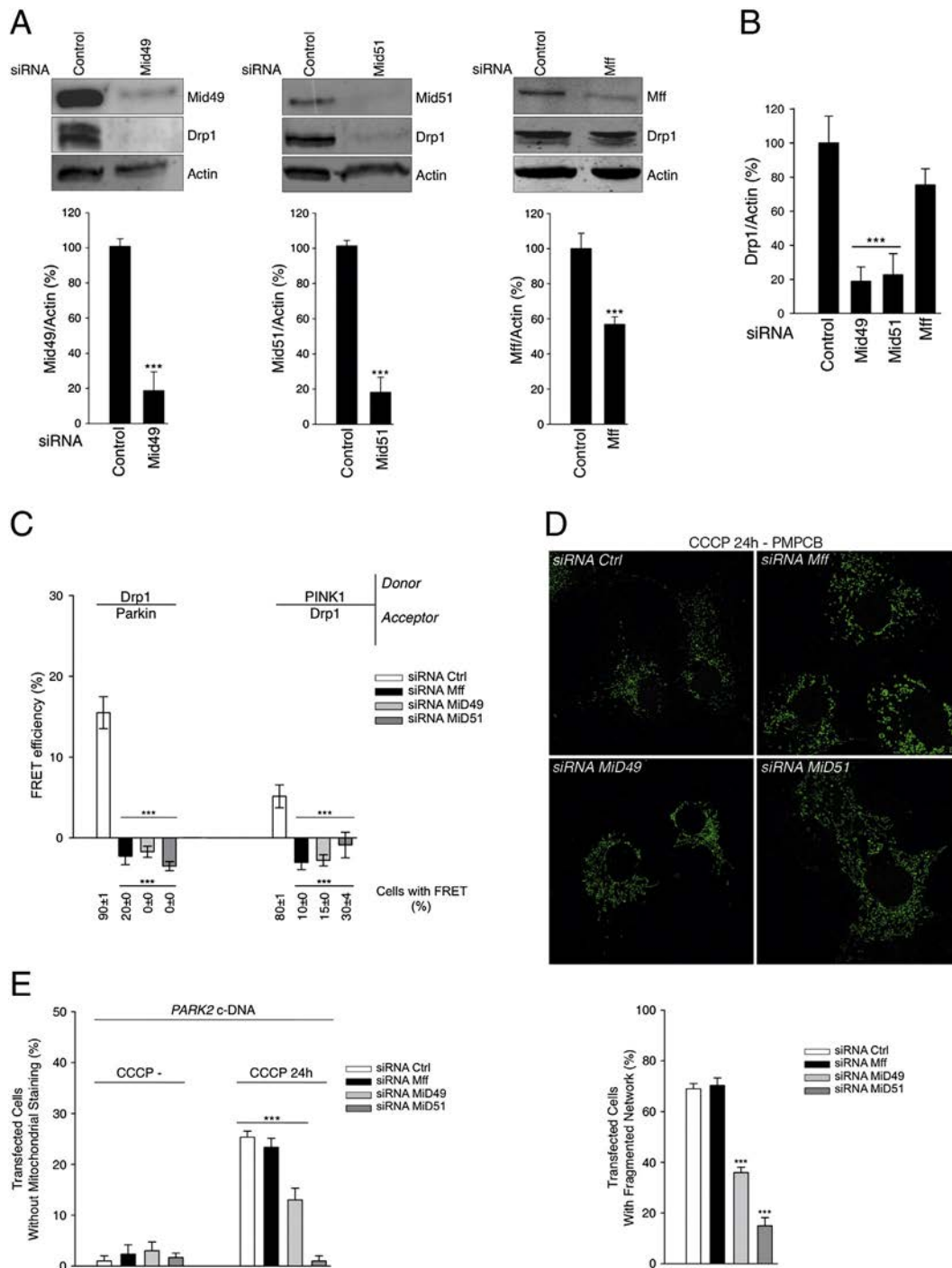


Fig. 10. MiD49 and MiD51 are involved in Drp1 recruitment to mitochondria and Parkin-dependent mitophagy. (A) Representative Western blots illustrate the efficiency of the siRNA-mediated downregulation of MiD49, MiD51 and Mff, and Drp1 levels in COS7 cells (upper panels); degree of depletion of MiD49, MiD51 and Mff (lower panels); data are means \pm SEM from three independent experiments. (B) Quantitative analysis of Western blots as in (A), showing Drp1 abundance in cells depleted for MiD49, MiD51 and Mff. Data are means \pm SEM from three independent experiments. (C) Mean FRET efficiencies and percentages of cells displaying FRET for the indicated donor/acceptor pairs in COS7 cells depleted for MiD49, MiD51 and Mff and treated with CCCP for 6 h. $n = 10$ cells from one experiment representative of three. Data are means \pm SEM (***) p -value < 0.001 versus siRNA Ctrl condition within each donor/acceptor pair. (D) Representative images illustrating the morphology of mitochondria stained for the matrix marker PMPCB in cells transfected with control (Ctrl) siRNA or siRNAs specific for MiD49, MiD51 and Mff and treated with CCCP (upper panels). Quantification of the percentage of cells with fragmented mitochondrial network in the above experiment illustrates attenuation of mitochondrial fission in cells depleted for MiD49 and MiD51. (E) Mitochondrial clearance, estimated as the proportion of transfected cells lacking mitochondrial staining (PMPCB) after CCCP treatment in cells overproducing Parkin, shows a significant decrease in cells depleted for MiD49 and MiD51. Data are means \pm SEM from one representative experiment out of three, performed in triplicate (D, E). (***) p -value < 0.001 versus siRNA Ctrl (D) or corresponding "CCCP—" condition (E).

398 morphology may reflect mitochondrial fragmentation prior to degradation.
 399 Conversely, mitochondrial elongation following PINK1 depletion
 400 may reflect a protective compensatory response to impaired mitochon-
 401 drial quality, similarly to what reported in other stress paradigms,

including starvation conditions [42,43]. The fission-promoting activity
 of Parkin may reflect an additional role in the regulation of mitochon-
 drial dynamics, beyond the function of the protein in the degradation
 of dysfunctional mitochondria. This possibility is supported by our

integrated analysis of PD-causing Parkin substitutions, showing that regulation of mitochondrial morphology by Parkin highlighted under basal conditions is not mandatory for efficient mitochondrial clearance.

Our results suggest that the impact of Parkin on mitochondrial dynamics depends on the phosphorylation status of Drp1. Phosphorylation of various serine residues of Drp1 have been reported to regulate mitochondrial dynamics in different physiological and pathological conditions (e.g. during mitosis, under oxidative stress, nutrient starvation, or during voltage-dependent calcium channel-associated calcium signaling) [54]. Phosphorylation of serine 637 in Drp1 human brain isoform (isoform 1) by protein kinase A inhibits mitochondrial division, while dephosphorylation of this residue by the calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin promotes mitochondrial fission [40,55–57]. In contrast, phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase α of the same residue in Drp1 isoform 3 (serine 600) triggers mitochondrial fragmentation [41]. Several other Drp1 isoforms encoded by multiple transcripts generated by alternative splicing have been described (cf. NCBI Reference Sequence Database, RefSeq), hinting at possible complex interrelationships between different molecular mechanisms regulating Drp1 activity. Here, we show that pharmacological treatments that interfere with or antagonize the calcium/calmodulin/calcineurin signaling pathway prevent the mitochondrial morphological changes induced by Parkin. These treatments increased the abundance of the pool of Drp1 phosphorylated on serine 637, suggesting that Parkin-mediated fission requires either calcineurin-dependent dephosphorylation or inhibition of PKA-dependent phosphorylation of this residue. The concomitant phosphorylation of serine 600 of isoform 3 by calcium/calmodulin-dependent protein kinase α or of other serine residues in other Drp1 isoforms is not excluded.

In contrast, previous work in a neuroblastoma-derived cell line has provided evidence that loss of PINK1 activates calcineurin-dependent Drp1 dephosphorylation, leading to mitochondrial fragmentation [13]. This is but one example of the various antagonistic mechanisms by which PINK1 and Parkin have been reported to modulate mitochondrial morphology in mammalian cells (reviewed by [16]). Accordingly, Parkin has been shown to promote the ubiquitin-dependent degradation of the pro-fission proteins Drp1 and Fis1, and of the mitochondrial pro-fusion factors, Mfn1 and Mfn2 [33,58,59]; PINK1 deficiency has been associated with reductions in transcript levels of the fission factor Mtp18 [60]. Altogether, these observations illustrate the versatility of PINK1 and Parkin and hint at the existence of a complex intertwined network of direct and indirect mechanisms by which these proteins participate in adapting the mitochondrial network to the specific requirements of the cell in different physiological and pathological conditions.

Consistent with previous studies, we showed that Drp1-dependent fission is responsible for the fragmentation of the mitochondrial network at early time points following mitochondrial depolarization, and that it facilitates mitochondrial clearance promoted by Parkin [33,61]. In contrast, Drp1 did not play a role in mitochondrial aggregation or recruitment of the ubiquitin-binding adaptor protein p62/SQSTM1, which are dispensable for mitochondrial degradation [29,62]. FRET analyses revealed that the mitochondrial recruitment of Drp1 is coordinated with that of Parkin following mitochondrial membrane depolarization. We showed that in cells treated with CCCP, Drp1 is found in proximity of both Parkin and PINK1 on mitochondria. The interaction between PINK1 and Drp1 was strengthened by the presence of exogenous Parkin and abolished by its depletion, whereas that between Parkin and Drp1 was weakened by PINK1 silencing. These results suggest that PINK1 and Parkin recruit Drp1 cooperatively. PINK1 accumulation precedes Parkin translocation to the outer mitochondrial membrane and is therefore likely to be a prerequisite for Drp1 recruitment. Whether Drp1 is recruited in proximity of PINK1 prior to Parkin, or whether Parkin and Drp1 first associate in the cytosol and then translocate to the outer mitochondrial membrane remains to be determined. The cooperative effect between Parkin and PINK1 in Drp1 recruitment was preserved

by the G328E Parkin substitution but compromised by the R275W substitution, which abrogated the ability of the protein to facilitate Drp1 recruitment in proximity of PINK1, as well as its ability to promote mitophagy. Therefore, association of Drp1 in proximity of PINK1 and Parkin may be crucial for mitophagy to proceed efficiently. Of note, these molecular interactions were also detected under basal conditions, albeit with lower FRET efficiencies, supporting their physiological relevance.

Initiation of mitochondrial clearance requires coordination between various events controlled by PINK1 and/or Parkin, including degradation of Mfn1/2 to prevent fusion of dysfunctional mitochondria to the healthy network [33,58,59]; degradation of the mitochondrial outer membrane GTPase Miro, to disconnect mitochondria from microtubules [22]; and recruitment of Atg proteins [63]. The mechanisms underlying the spatiotemporal orchestration of these events are largely unknown. Our findings suggest that sites of Drp1-dependent fission on depolarized mitochondria coincide with sites at which Parkin associates with PINK1 to trigger mitochondrial clearance. We have recently shown that Parkin is recruited by PINK1 in proximity of the TOM machinery [39], raising the possibility that this protein complex constitutes a molecular scaffold for the recruitment of the various molecular actors of mitophagy.

Proteins of the outer mitochondrial membrane involved in Drp1 recruitment may associate with this complex. The respective roles and potential reciprocal relations between putative mitochondrial receptors of Drp1 are poorly understood [46–50,64]. Our FRET analyses in cells depleted for Mff, MiD49 and MiD51 indicate that each of these proteins participate to a certain extent in Drp1 recruitment in proximity of PINK1 and Parkin on depolarized mitochondria, possibly with additive or cooperative effects. However, only depletion of MiD49 and MiD51 had a significant impact on mitochondrial clearance, associated with impairment of mitochondrial fission triggered by CCCP, indicating a preferential role of these adaptors. Consistent with our previous study [39], these observations show that FRET effects need to be considered in conjunction with functional readouts, as lack of FRET does not necessarily reflect loss of molecular proximities but may be the result of weakened protein–protein interactions or nonpermissive orientations of protein partners [38,39]. Remarkably, downregulation of MiD51 abolished Parkin-dependent mitophagy, supporting a broader role of this outer mitochondrial membrane protein in this process.

In conclusion, our study adds another piece to the complex puzzle of mechanisms by which Parkin modulates mitochondrial dynamics in different conditions, and supports the idea that PINK1 and Parkin have both cooperative and independent activities in mitochondrial maintenance. The molecular mechanisms behind and the physiological significance of the mitochondrial fission-promoting effect of Parkin in basal conditions remain to be clarified. In addition, future studies will have to address the precise mechanisms leading to recruitment of Drp1 to dysfunctional mitochondria, their relation with the specific steps of the mitochondrial degradation program mediated by the PINK1/Parkin pathway, and their possible link to neurodegeneration in autosomal recessive Parkinson's disease.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.012>.

Acknowledgements

We are grateful to Aurélien Dauphin and the Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière for technical assistance. We also thank Patrick P. Michel and Serge Guerreiro for helpful discussions. This research has received funding from *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, *Association France Parkinson*, *Fondation de France*, *Agence Nationale de la Recherche (MNP)*, MEFOPA (funded by the EU 7th Framework Programme, Grant Agreement HEALTH-2009-241791), *Fondation ICM*, "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06. Funding sources were not involved in study design. L.B. was supported by *Institut National de la Santé et de la Recherche and Neuropôle de Recherche Francilien*.

References

- 537 [1] O. Corti, S. Lesage, A. Brice, What genetics tells us about the causes and mechanisms
538 of Parkinson's disease, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 1161–1218.
- 539 [2] J. Park, S.B. Lee, S. Lee, Y. Kim, S. Song, S. Kim, E. Bae, J. Kim, M. Shong, J.M. Kim, J.
540 Chung, Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented
541 by parkin, *Nature* 441 (2006) 1157–1161.
- 542 [3] I.E. Clark, M.W. Dodson, C. Jiang, J.H. Cao, J.R. Huh, J.H. Seol, S.J. Yoo, B.A. Hay, M. Guo,
543 *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically
544 with parkin, *Nature* 441 (2006) 1162–1166.
- 545 [4] Y. Yang, S. Gehrke, Y. Imai, Z. Huang, Y. Ouyang, J.W. Wang, L. Yang, M.F. Beal, H.
546 Vogel, B. Lu, Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degener-
547 ation caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin, *Proc. Natl.*
548 *Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10793–10798.
- 549 [5] A.C. Poole, R.E. Thomas, L.A. Andrews, H.M. McBride, A.J. Whitworth, L.J. Pallanck,
550 The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology, *Proc. Natl. Acad.*
551 *Sci. U. S. A.* 105 (2008) 1638–1643.
- 552 [6] H. Deng, M.W. Dodson, H. Huang, M. Guo, The Parkinson's disease genes pink1 and
553 parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*, *Proc. Natl.*
554 *Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 14503–14508.
- 555 [7] Y. Yang, Y. Ouyang, L. Yang, M.F. Beal, A. McQuibban, H. Vogel, B. Lu, Pink1 regulates
556 mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery,
557 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 7070–7075.
- 558 [8] J.L. Burman, S. Yu, A.C. Poole, R.B. Decal, L. Pallanck, Analysis of neural subtypes
559 reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin
560 mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 10438–10443.
- 561 [9] N. Exner, B. Treske, D. Paquet, K. Holmstrom, C. Schiesling, S. Gispert, I. Carballal,
562 R.H. Hoepken, T. Gasser, R. Kruger, K.F. Winklhofer, F. Vogel, A.S. Reichert, G.
563 Auburger, P.J. Kahle, B. Schmidt, C. Haass, Loss-of-function of human
564 PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin, *J. Neurosci.*
565 27 (2007) 12413–12418.
- 566 [10] H. Mortiboys, K.J. Thomas, W.J. Koopman, S. Klaffke, P. Abou-Sleiman, S. Olpin, N.W.
567 Wood, P.H. Willems, J.A. Smeitink, M.R. Cookson, O. Bandmann, Mitochondrial
568 function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts, *Ann. Neurol.*
569 64 (2008) 555–565.
- 570 [11] A.K. Lutz, N. Exner, M.E. Fett, J.S. Schlehe, K. Kloos, K. Lammermann, B. Brunner, A.
571 Kurz-Drexler, F. Vogel, A.S. Reichert, L. Bouman, D. Vogt-Weisenhorn, W. Wurst, J.
572 Tatzelt, C. Haass, K.F. Winklhofer, Loss of Parkin or PINK1 function increases Drp1-
573 dependent mitochondrial fragmentation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22938–22951.
- 574 [12] R.K. Dagda, S.J. Cherra III, S.M. Kulich, A. Tandon, D. Park, C.T. Chu, Loss of pink1
575 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial
576 fission, *J. Biol. Chem.* (2009).
- 577 [13] A. Sandebring, K.J. Thomas, A. Beilina, M. van der Brug, M.M. Cleland, R. Ahmad, D.W.
578 Miller, I. Zambrano, R.F. Cowburn, H. Behbahani, A. Cedazo-Minguez, M.R. Cookson,
579 Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-
580 dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1, *PLoS One* 4 (2009) e5701.
- 581 [14] M. Cui, X. Tang, W.V. Christian, Y. Yoon, K. Tieu, Perturbations in mitochondrial
582 dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial
583 division inhibitor mdivi-1, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 11740–11752.
- 584 [15] W. Yu, Y. Sun, S. Guo, B. Lu, The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial
585 dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons,
586 *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 3227–3240.
- 587 [16] O. Corti, A. Brice, Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect
588 in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease, *Curr. Opin.*
589 *Neurobiol.* 23 (2013) 100–108.
- 590 [17] A. Sandebring, N. Dehvari, M. Perez-Manso, K.J. Thomas, E. Karpilovski, M.R.
591 Cookson, R.F. Cowburn, A. Cedazo-Minguez, Parkin deficiency disrupts calcium ho-
592 meostasis by modulating phospholipase C signalling, *FEBS J.* 276 (2009) 5041–5052.
- 593 [18] J.H. Shin, H.S. Ko, H. Kang, Y. Lee, Y.I. Lee, O. Pletinkova, J.C. Troconso, V.L. Dawson, T.
594 M. Dawson, PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegenera-
595 tion in Parkinson's disease, *Cell* 144 (2011) 689–702.
- 596 [19] Y. Kuroda, T. Mitsui, M. Kunishige, M. Shono, M. Akaike, H. Azuma, T. Matsumoto,
597 Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells, *Hum. Mol. Genet.*
598 15 (2006) 883–895.
- 599 [20] C. Pacelli, D. De Rasmio, A. Signorile, I. Grattagliano, G. di Tullio, A. D'Orazio, B. Nico,
600 G.P. Comi, D. Ronchi, E. Ferranini, D. Pirollo, P. Seibel, S. Schubert, A. Gaballo, G.
601 Villani, T. Cocco, Mitochondrial defect and PGC-1 α dysfunction in parkin-
602 associated familial Parkinson's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2011)
603 1041–1053.
- 604 [21] L. Song, Y. Shan, K.C. Lloyd, G.A. Cortopassi, Mutant Twinkle increases dopaminergic
605 neurodegeneration, mtDNA deletions and modulates Parkin expression, *Hum. Mol.*
606 *Genet.* 21 (2012) 5147–5158.
- 607 [22] X. Wang, D. Winter, G. Ashrafi, J. Schlehe, Y.L. Wong, D. Selkoe, S. Rice, J. Steen, M.J.
608 LaVoie, T.L. Schwarz, PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degra-
609 dation to arrest mitochondrial motility, *Cell* 147 (2011) 893–906.
- 610 [23] S. Gandhi, A. Wood-Kaczmar, Z. Yao, H. Plum-Favreau, E. Deas, K. Klupsch, J.
611 Downward, D.S. Latchman, S.J. Tabrizi, N.W. Wood, M.R. Duchen, A.Y. Abramov,
612 PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to
613 calcium-induced cell death, *Mol. Cell* 33 (2009) 627–638.
- 614 [24] A. Weihofen, K.J. Thomas, B.L. Ostaszewski, M.R. Cookson, D.J. Selkoe, Pink1 forms a
615 multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial
616 trafficking (dagger), *Biochemistry* (2009).
- 617 [25] O. Rothfuss, H. Fischer, T. Hasegawa, M. Maisel, P. Leitner, F. Miesel, M. Sharma, A.
618 Bornemann, D. Berg, T. Gasser, N. Patenge, Parkin protects mitochondrial genome
619 integrity and supports mitochondrial DNA repair, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009)
620 3832–3850.
- [26] B.N. Johnson, A.K. Berger, G.P. Cortese, M.J. LaVoie, The ubiquitin E3 ligase parkin
621 regulates the proapoptotic function of Bax, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109
622 (2012) 6283–6288.
- [27] B.N. Johnson, R.A. Charan, M.J. LaVoie, Recognizing the cooperative and independent
623 mitochondrial functions of Parkin and PINK1, *Cell Cycle* 11 (2012) 2775–2776.
- [28] D. Narendra, A. Tanaka, D.F. Suen, R.J. Youle, Parkin is recruited selectively to
624 impaired mitochondria and promotes their autophagy, *J. Cell Biol.* 183 (2008)
625 795–803.
- [29] D. Narendra, L.A. Kane, D.N. Hauser, I.M. Fearnley, R.J. Youle, p62/SQSTM1 is
626 required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1
627 is dispensable for both, *Autophagy* 6 (2010) 1090–1106.
- [30] S. Geisler, K.M. Holmstrom, D. Skujat, F.C. Fiesel, O.C. Rothfuss, P.J. Kahle, W.
628 Springer, PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/
629 SQSTM1, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 119–131.
- [31] N. Matsuda, S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C.A. Gautier, Y.S. Sou, S. Saiki, S.
630 Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, K. Tanaka, PINK1 stabilized
631 by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and
632 activates latent Parkin for mitophagy, *J. Cell Biol.* 189 (2010) 211–221.
- [32] C. Vives-Bauza, C. Zhou, Y. Huang, M. Cui, R.L. de Vries, J. Kim, J. May, M.A. Tocilescu,
633 W. Liu, H.S. Ko, J. Magrane, D.J. Moore, V.L. Dawson, R. Grailhe, T.M. Dawson, C. Li, K.
634 Tieu, S. Przedborski, PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in
635 mitophagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 378–383.
- [33] A. Tanaka, M.M. Cleland, S. Xu, D.P. Narendra, D.F. Suen, M. Karbowski, R.J. Youle,
636 Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced
637 by Parkin, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 1367–1380.
- [34] F. Legros, A. Lombes, P. Frachon, M. Rojo, Mitochondrial fusion in human cells is
638 efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins,
639 *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4343–4354.
- [35] C. Hampe, H. Ardila-Osorio, M. Fournier, A. Brice, O. Corti, Biochemical analysis of
640 Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with
641 monoubiquitylation capacity, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2059–2075.
- [36] V.H. W.J. Koopman, S. Verkaar, L.W. van den Heuvel, J.A. Smeitink, P.H. Willems,
642 Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity
643 are tightly correlated in isolated human complex I deficiency, *Am. J. Physiol. Cell*
644 *Physiol.* 289 (4) (Oct 2005) C881–C890.
- [37] V. Agier, P. Oliviero, J. Laine, C. L'Hermitte-Stead, S. Girard, S. Fillaut, C. Jardel, F.
645 Bouillaud, A.L. Bulteau, A. Lombes, Defective mitochondrial fusion, altered respiratory
646 function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1
647 mutations, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1570–1580.
- [38] E.L. Snapp, R.S. Hegde, Rational design and evaluation of FRET experiments to mea-
648 sure protein proximities in cells, *Curr. Protoc. Cell Biol.* (2006) (Chapter 17, Unit 17
649 19).
- [39] G. Bertolin, R. Ferrando-Miguel, M. Jacoupy, S. Traver, K. Grenier, A.W. Greene, A.
650 Dauphin, F. Waharte, A. Bayot, J. Salameo, A. Lombes, A.L. Bulteau, E.A. Fon, A.
651 Brice, O. Corti, The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/
652 PARKIN-dependent mitochondrial clearance, *Autophagy* 9 (2013) 1801–1817.
- [40] J.T. Cribbs, S. Strack, Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent
653 protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death,
654 *EMBO Rep.* 8 (2007) 939–944.
- [41] X.J. Han, Y.F. Lu, S.A. Li, T. Kaitsuka, Y. Sato, K. Tomizawa, A.C. Nairn, K. Takei, H.
655 Matsui, M. Matsushita, CaM kinase I α -induced phosphorylation of Drp1 regu-
656 lates mitochondrial morphology, *J. Cell Biol.* 182 (2008) 573–585.
- [42] L.C. Gomes, G. Di Benedetto, L. Scorrano, During autophagy mitochondria elongate,
657 are spared from degradation and sustain cell viability, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011)
658 589–598.
- [43] A.S. Rambold, B. Kostelecky, N. Elia, J. Lippincott-Schwartz, Tubular network
659 formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during
660 nutrient starvation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 10190–10195.
- [44] S. Duvezin-Caubet, M. Koppen, J. Wagener, M. Zick, L. Israel, A. Bernacchia, R. Jagasia,
661 E.I. Rugarli, A. Imhof, W. Neupert, T. Langer, A.S. Reichert, OPA1 processing
662 reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease
663 in mitochondria, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 3582–3590.
- [45] L. Griparic, T. Kanazawa, A.M. van der Bliek, Regulation of the mitochondrial
664 dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage, *J. Cell Biol.* 178 (2007) 757–764.
- [46] C.S. Palmer, L.D. Osellame, D. Laine, O.S. Koutsopoulos, A.E. Frazier, M.T. Ryan, Mid49
665 and Mid51, new components of the mitochondrial fission machinery, *EMBO Rep.* 12
666 (2011) 565–573.
- [47] J. Zhao, T. Liu, X. Wang, M. Qu, P. Uhlen, N. Tomilin, O. Shupliakov, U. Lendahl,
667 M. Nister, Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and
668 promotes mitochondrial fusion rather than fission, *EMBO J.* 30 (2011) 2762–2778.
- [48] S. Koirala, Q. Guo, R. Kalia, H.T. Bui, D.M. Eckert, A. Frost, J.M. Shaw, Interchangeable
669 adaptors regulate mitochondrial dynam assembly for membrane scission, *Proc.*
670 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E1342–E1351.
- [49] O.C. Loson, Z. Song, H. Chen, D.C. Chan, Fis1, Mff, Mid49, and Mid51 mediate Drp1
671 recruitment in mitochondrial fission, *Mol. Cell* 24 (2013) 659–667.
- [50] C.S. Palmer, K.D. Elgass, R.G. Parton, L.D. Osellame, D. Stojanovski, M.T. Ryan, Adaptor
672 proteins Mid49 and Mid51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment
673 and are specific for mitochondrial fission, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 27584–27593.
- [51] S. Vilain, G. Esposito, D. Haddad, O. Schaap, M.P. Dobreva, M. Vos, S. Van Meensel, V.
674 A. Morais, B. De Strooper, P. Verstreken, The yeast complex I equivalent NADH dehy-
675 drogenase rescues pink1 mutants, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002456.
- [52] A.K. Muller-Rischart, A. Pils, P. Beaudette, M. Patra, K. Hadian, M. Funke, R. Peis, A.
676 Deinlein, C. Schweimer, P.H. Kuhn, S.F. Lichtenhaler, E. Motori, S. Hrelia, W. Wurst,
677 D. Trumbach, T. Langer, D. Krappmann, G. Dittmar, J. Tatzelt, K.F. Winklhofer, The E3
678 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination
679 of NEMO, *Mol. Cell* 49 (2013) 908–921.

- 707 [53] M. Lazarou, S.M. Jin, L.A. Kane, R.J. Youle, Role of PINK1 binding to the TOM complex
708 and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase
709 Parkin, *Dev. Cell* 22 (2011) 320–333.
- 710 [54] H. Otera, N. Ishihara, K. Mihara, New insights into the function and regulation of
711 mitochondrial fission, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 1256–1268.
- 712 [55] N. Taguchi, N. Ishihara, A. Jofuku, T. Oka, K. Mihara, Mitotic phosphorylation of
713 dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission, *J. Biol. Chem.*
714 282 (2007) 11521–11529.
- 715 [56] C.R. Chang, C. Blackstone, Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of
716 Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology, *J. Biol. Chem.* 282
717 (2007) 21583–21587.
- 718 [57] G.M. Cereghetti, V. Costa, L. Scorrano, Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial
719 fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin, *Cell*
720 *Death Differ.* 17 (2010) 1785–1794.
- 721 [58] E. Ziviani, R.N. Tao, A.J. Whitworth, *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochon-
722 drial translocation and ubiquitinates mitofusin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107
723 (2010) 5018–5023.
- 724 [59] M.E. Gegg, J.M. Cooper, K.Y. Chau, M. Rojo, A.H. Schapira, J.W. Taanman, Mitofusin 1
725 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon
726 induction of mitophagy, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 4861–4870.
- [60] S. Gispert, F. Ricciardi, A. Kurz, M. Azizov, H.H. Hoepken, D. Becker, W. Voos, K.
Leuner, W.E. Muller, A.P. Kudin, W.S. Kunz, A. Zimmermann, J. Roeper, D. Wenzel,
M. Jendrach, M. Garcia-Arencibia, J. Fernandez-Ruiz, L. Huber, H. Rohrer, M.
Barrera, A.S. Reichert, U. Rub, A. Chen, R.L. Nussbaum, G. Auburger, Parkinson phe-
notype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial
dysfunction in absence of neurodegeneration, *PLoS One* 4 (2009) e5777.
- [61] G. Twig, A. Elorza, A.J. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E.
Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, O.S.
Shirihai, Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimina-
tion by autophagy, *EMBO J.* 27 (2008) 433–446.
- [62] K. Okatsu, K. Saisho, M. Shimanuki, K. Nakada, H. Shitara, Y.S. Sou, M. Kimura, S. Sato,
N. Hattori, M. Komatsu, K. Tanaka, N. Matsuda, p62/SQSTM1 cooperates with Parkin
for perinuclear clustering of depolarized mitochondria, *Genes Cells* 15 (2010)
887–900.
- [63] E. Itakura, C. Kishi-Itakura, I. Koyama-Honda, N. Mizushima, Structures containing
Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at
initial stages of Parkin-mediated mitophagy, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1488–1499.
- [64] H. Otera, C. Wang, M.M. Cleland, K. Setoguchi, S. Yokota, R.J. Youle, K. Mihara, Mff
is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial
fission in mammalian cells, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 1141–1158.

747

IX. ANNEXES

IX.1 Article 3 : Spécificité tissulaire et cellulaire des défaut mitochondriaux dans les souris déficientes en Parkine (*PARK2* -/-)

| | |
|---|--------|
| | p. 248 |
| IX.1.1 Méthodologie | p. 249 |
| IX.1.1.a Consommation d'oxygène | p. 249 |
| <u>Le système Oroboros</u> | p. 249 |
| <u>Système d'analyses des fluxes extracellulaires, « XF Bioenergetic Analysis »</u> | p. 250 |
| IX.1.1.b Activités enzymatiques mesurées sur mitochondries isolées | p. 251 |
| IX.1.2 Résultats principaux et Discussion | p. 253 |

IX.2 Article 4 : Le défaut de la capacité de rétention calcique mitochondriale précède la manifestation des troubles de la motricité chez la souris transgénique pour la forme mutée G93A de la Superoxyde Dismutase Cu/Zn

| | |
|---|--------|
| | p. 256 |
| IX.2.1 Méthodologie | p. 256 |
| IX.2.1a <u>Capacité calcique mitochondriale</u> | p. 256 |
| IX.2.2 Discussion | p. 259 |

IX.2.3 Articles 3 et 4

IX.1 Article 3 : Spécificité tissulaire et cellulaire des défaut mitochondriaux dans les souris déficientes en Parkine (*PARK2* -/-)

Pendant ma permanence dans l'équipe du Dr Corti, j'ai travaillé sur un deuxième projet en étroite collaboration avec le Dr Anne Lombès (Département Mitochondrie, bioénergétique, métabolisme et signalisation, Institut Cochin, Paris): « L'étude des conséquences de l'inactivation du gène Parkine sur la physiologie mitochondriale chez la souris ».

Au cours de ce dernier projet, nous avons mis en évidence un défaut de la consommation d'oxygène dans le striatum des souris déficientes en Parkine (*PARK2*-/-). La caractérisation des fonctions mitochondriales dans ce modèle a été terminée après la fin de mon contrat dans l'équipe du Dr Corti, par mon collègue Clément Gautier, co-auteur de l'article publiée sur PLoS ONE (Juin 2014, Volume 9, Issue 6).

Par la combinaison de différentes techniques de pointe en matière de respirométrie à haute résolution, nous associons dans cette étude la caractérisation *in vivo* de la fonction mitochondriale chez la souris *PARK2*-/- aux mesures de respirométrie faites *in vitro* dans des neurones et des astrocytes en culture primaire, isolées à partir de ce même modèle. Ces cellules ont été analysées en collaboration avec la société biopharmaceutique Trophos (Marseille) dans le cadre du projet européen « Mendelian Forms of Parkinson's disease » (MEFOPA).

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un défaut de la respiration dans le striatum des souris *PARK2*-/- à partir de l'âge de 9 mois, qui n'est pas observé dans d'autres tissus, comme le mésencéphale ou le foie. Ce défaut a lieu en absence de défauts des activités des complexes de la chaîne respiratoire ; toutefois des légères différences en termes de sensibilité à la dépolarisation, de niveaux des systèmes antioxydants, ainsi que d'accumulation des produits de l'oxydation protéique et lipidique sont observées entre les mitochondries issues des souris des deux génotypes.

Les résultats de l'analyse de la respiration mitochondriale des populations striatales, neuronales et astrocytaires, issues des embryons et des souriceaux des deux génotypes, confirment la présence d'un défaut significatif de la fonction mitochondriale dans les cellules *PARK2*-/-.

IX.1.1 Méthodologie

IX.1.1.a Consommation d'oxygène

En alternative à l'oxymétrie par électrode type Hansatech (décrite dans la section Projet I), pendant l'exécution de ce projet nous avons utilisé les nouvelles technologies à haute résolution comme le système Oroboros et le système d'analyse des flux extracellulaires XF (XF Extracellular Flux Analyzer, Seahorse). Par ces systèmes il est possible mesurer la consommation d'oxygène à partir d'homogénats des tissus ou de quantités limitées des tissus ou de cellules.

Le système Oroboros

L'utilisation du système Oroboros, nous a permis de mesurer la consommation d'oxygène dans les fractions post-nucléaires issues du cortex, du striatum ainsi que du muscle et du foie de souris transgéniques ou leurs contrôles, évitant ainsi les méthodes de purification par ultracentrifugation des fractions mitochondriales. Le système Oroboros permet d'effectuer des mesures sur des quantités minimales de tissu (environ 20 mg pour le striatum d'une souris). Les mesures sont faites sur l'entière population mitochondriale présente dans l'échantillon, ce qui évite la sélection des mitochondries plus résistantes au cours des centrifugations.

Le système Oroboros est doué d'une électrode significativement plus sensible par rapport à l'électrode de Clark. La cathode en or et l'anode en argent sont placées dans une chambre adaptée à des grands volumes (2 ml). Le logiciel permet d'analyser en même temps la concentration d'oxygène dans la chambre et la dérivée de la vitesse de consommation d'oxygène (Fig. 61).

Les paramètres d'analyses sont les mêmes que ceux obtenus avec les électrodes de type Hansatech.

VO_2 (ADP) - VO_2 (Oligomycine) = respiration servant à la synthèse d'ATP (VO_2 ATP)

VO_2 Max (CCCP) - VO_2 (KCN) = respiration maximale (VO_2 Max)

VO_2 Max (CCCP) - VO_2 basale = réserve respiratoire.

Rapport de contrôle respiratoire = VO_2 ADP / VO_2 (Oligomycine)

VO_2 de fuite = VO_2 (Oligomycine) - VO_2 (KCN)

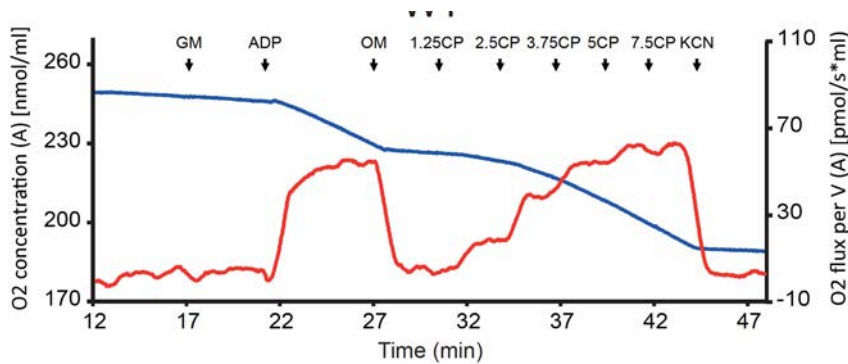


Figure 61 : Exemple d'une courbe pour l'analyse de la consommation d'oxygène (homogénat de striatum d'une souris contrôle) obtenue par le système Oroboros. En bleu la courbe correspondant à la concentration d'oxygène dans la chambre de mesure ; en rouge, la dérivée de la vitesse de la consommation d'oxygène

Système d'analyses des flux extracellulaires, « XF Bioenergetic Analysis »

L'utilisation du « XF Extracellular Flux Analyzer » (Seahorse Bioscience) nous a permis de caractériser du point de vue bioénergétique les astrocytes et les neurones primaires. Brièvement, l'analyse est faite en temps réel dans un instrument multi-puits. Deux biosenseurs à fluorescence, un pour la mesure de consommation d'oxygène (OCR, Oxygen Consumption Rate, pmoles/minute) et l'autre pour l'acidification du milieu de respiration (pH) (ECAR, ExtraCellular Acidification Rate, mpH/minute), sont placés sur les terminaisons des sondes en plastique qui forment la cartouche capteur XF. Les sondes sont aussi équipées de ports pour l'injection d'agents pharmacologiques pendant les mesures (Fig. 62).

Une micro-chambre de mesure contenant un volume extrêmement réduit (quelques μl) de milieu, se forme au-dessus d'une monocouche de cellules lorsque la cartouche capteur XF est positionnée pour fermer les puits. La consommation d'oxygène cellulaire (respiration) et l'excrétion de protons (glycolyse) causent des changements rapides de la fluorescence des biosenseurs, qui sont détectés à quelques secondes d'intervalles.

La pente de consommation d'oxygène et celle de l'acidification du milieu déterminent l'OCR et ECAR, respectivement.

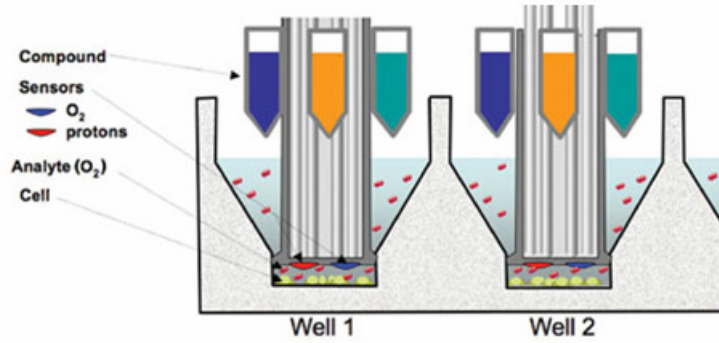


Figure 62 : représentation du système « XF Extracellular Flux Analyzer », Seahorse Bioscience.

IX.1.1.b Activités enzymatiques à partir de mitochondries isolées

Les réactions sur lesquelles se base l'essai des activités enzymatiques individuelles des complexes de la chaîne respiratoire et de l'enzyme du cycle de Krebs citrate synthétase (enzyme de la matrice) sont résumées ci-dessous (Fig. 63, page suivante).

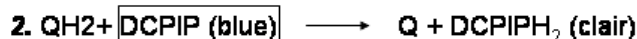
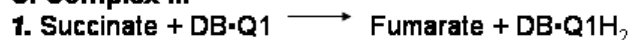
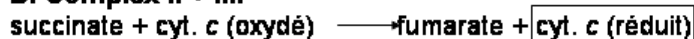
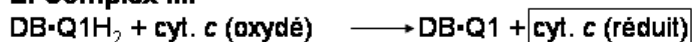
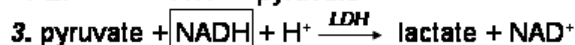
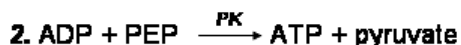
A. Citrate Synthétase:**B. Complex I:****C. Complex II:****D. Complex II + III:****E. Complex III:****F. Complex IV:****G. Complex V:**

Figure 63 (d'après Frazier AR and Thornburn DR 2012, et les méthodes de A Starkov et A. Lombès) : schématisation des essais cinétiques faits par spectrophotométrie, pour la mesure des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'analyse des changements des absorbances, à longueurs d'onde déterminées, indiquent (dans les rectangles) la production (A,D,E) ou la consommation (B,C,F,G) des réactifs. L'essai pour l'activité de l'enzyme citrate synthétase mesure la génération des groupes sulfhydryles libres qui réagissent avec l'acide dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) (A). Les activités des complexes I-IV sont mesurées par le transfert d'électrons d'un intermédiaire à l'autre (B-F). L'activité du complexe V est mesurée par l'activité de la réaction renversée (ATPase), qui lie l'hydrolyse de l'ATP à l'oxydation du NADH, en présence des enzymes pyruvate kinase (PK) et lactate déshydrogenase (LDH) (G). Les absorbances sont mesurées à: (A) 412 nm, pour l'anion thionitrobenzoate, (B,G) 340 nm pour le NADH, (C) 280 nm pour le DBQ1, (D-F) 550 nm pour le cytochrome *c* réduit. Le DB (decylbenzylquinone) est l'analogue soluble du CoQ endogène.

IX.1.2 Résultats principaux et discussion

Cette étude consiste en l'évaluation de la fonction mitochondriale dans le modèle des souris déficientes en Parkine (*PARK2* *-/-*) par une stratégie intégrant différentes approches méthodologiques. Ces approches comprennent : l'analyse de la respiration par la polarographie ou par l'utilisation des systèmes de microplaques à fluorescence ; l'analyse de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par spectrophotométrie ; l'analyse du potentiel de membrane interne mitochondriale par l'utilisation de la sonde fluorescente rhodamine 123 ; l'analyse du contenu en ADN mitochondrial par PCR en temps réel ; les mesures des taux d'oxydation protéique et lipidique et des niveaux des systèmes de défense antioxydants, afin d'évaluer l'impact du stress oxydant sur les composantes cellulaires.

Par ces approches nous mettons en évidence une diminution de la respiration mitochondriale dans les striatum des souris *PARK2**-/-* à différentes âges. Cette diminution est évidente dans les mesures effectuées par le système à haute résolution Oroboros, mais n'est pas mise en évidence par la respirométrie classique.

En effet les problématiques de fragilisation mitochondriale et sélection des populations mitochondriales plus résistantes sont éliminées lorsqu'on procède à la préparation des homogénats pour l'analyse Oroboros, ce qui contribue à augmenter la sensibilité de ce système de mesure.

Le défaut de respiration a été aussi mis en évidence *in vitro*, dans des préparations de neurones striataux, et non corticaux, issus des embryons *PARK2**-/-*. De plus, parmi les populations striatales, les cultures astrocytaires issues de souriceaux *PARK2**-/-* manifestent une altération plus légère de la respiration, par rapport aux cultures neuronales.

In vivo, nous avons exploré la possibilité qu'un défaut des activités de la chaîne respiratoire, y compris du Complexe I, puisse être à l'origine du déficit respiratoire observé, en mettant en jeu la mesure de ces activités par spectrophotométrie ; toutefois, en ce qui concerne ces activités, nous n'avons pas retrouvé de différence entre les mitochondries isolées des souris *PARK2**-/-* et celles isolées des souris contrôles.

Nous avons exploré un autre paramètre indicatif de la bioénergétique mitochondriale, le potentiel de membrane interne mitochondriale $\Delta\psi_m$, qui ne s'est pas révélé différent

entre les mitochondries isolées à partir de souris *PARK2*^{-/-} et celles isolées à partir de souris contrôles ; cependant, à un âge avancé, les souris déficientes en Parkine semblent plus sensible que le souris sauvages à l'agent découplant CCCP.

Enfin, si l'analyse de l'activité du protéasome n'a pas révélé de différence entre les souris *PARK2*^{-/-} et leurs contrôles, une augmentation plus précoce du contenu en protéines et lipides oxydés ainsi que la contemporaine augmentation du contenu en glutathion dans les fractions mitochondriales issues de souris *PARK2*^{-/-} témoigne de l'impact du stress oxydant sur les tissus neuronaux et de l'intégrité des systèmes antioxydants chez ces souris.

Comme l'on a expliqué dans le chapitre relatif à la physiologie mitochondriale, l'étude des modèles de drosophile invalidés pour le gène *PARK2* avait déjà fourni des éléments clé en faveur du rôle de la protéine dans la régulation de la physiologie mitochondriale. Dans ces modèles les défauts mitochondriaux dans les tissus à haute demande énergétique, y compris les tissus germinaux masculins et les muscles des ailes, sont sévères. Surtout dans les muscles des ailes les mitochondries apparaissent dégénérées, avec des crêtes fragmentées et gonflées. Ces modifications précèdent la mort cellulaire par apoptose (Pesah Y *et al.*, 2004; Greene JC *et al.*, 2003). Ces anomalies de dégénérescence mitochondriales sont aussi visibles dans un sous-ensemble de neurones dopaminergiques (Whitworth AJ *et al.*, 2005). Le modèle des souris *PARK2*^{-/-} est un modèle questionnable, ne présentant pas de signes robustes de « parkinsonisme », tels que la dégénérescence nigrostriatale, les altérations de la neurotransmission noradrénergique ou les troubles cognitifs (Perez FA and Palmiter RD, 2005). Les études qui avant nous ont présenté une caractérisation de la biochimie mitochondriale dans ce modèle ont mis en évidence plusieurs aspects dont l'importance n'est pas négligeable toutefois l'hétérogénéité méthodologique et l'incohérence des certains résultats engendrent un doute concernant la fiabilité des observations faites par les différents auteurs. La première étude a été réalisée par Palacino et collaborateurs. Dans cette étude, au coté de l'augmentation des niveaux de stress oxydant, comme la carbonylation des protéines et de la peroxydation des lipides, une réduction de l'activité respiratoire mitochondriale (état 3, état 4 et respiration découplée) et de l'expression des sous unités

des CoI et CoIV a été observée dans des mitochondries isolées à partir de striatum (Palacino JJ *et al.*, 2004). Fait intéressant, les CoI et le CoIV de la chaîne respiratoire mitochondriale sont déficitaires dans les tissus périphériques prélevés des patients atteints de la maladie de Parkinson porteurs des mutations de *PARK2* (Muftuoglu M *et al.*, 2004; Mortiboys H *et al.*, 2008). Toutefois de l'étude de Palacino n'émerge pas une vraie description de l'évolution temporelle de ces défauts et il n'est pas clair si les différents défauts observés coexistent aux mêmes âges.

Dans une deuxième étude analysant un autre modèle *PARK2* *-/-*, Stichel et ses collaborateurs, montrent à des âges avancées, un défaut de la fonction mitochondriale, mais seulement lors de la mesure de la respiration découplée, et non des états 3 et 4 (Stichel CC *et al.*, 2007).

Les résultats des analyses *in vivo* présentés dans notre étude rendent compte des différences engendrées par les différentes méthodologies d'isolement mitochondrial et de mesure oxygraphique, de la spécificité tissulaire et de l'évolution liée à l'âge des défauts observés. Des plus, ils sont fortement soutenus par les résultats des analyses *in vitro*, qui ajoutent des éléments concernant la spécificité tissulaire et cellulaire des défauts mitochondriaux observés.

IX.2 Article 4 : Le défaut de la capacité de rétention calcique mitochondriale précède la manifestation des troubles de la motricité chez la souris transgénique pour la forme mutée G93A de la superoxyde dismutase Cu/Zn

Ceci a été mon premier projet de recherche, je donnerai une brève description de l'aspect méthodologique plus important pour ma formation, et de sa place dans le contexte de la littérature.

Au cours du développement de ce projet de recherche à la Cornell University, New York nous avons approfondi les relations entre la progression du phénotype pathologique et la dysfonction mitochondriale dans un modèle animal de Sclérose Latérale Amyotrophique, SLA, les souris transgéniques pour la forme mutée G93A de la Superoxyde Dismutase Cu/Zn, SOD1. En particulier, je me suis focalisée sur la capacité mitochondriale de stockage du Ca^{2+} , vu l'importance de la mitochondrie comme système tampon des variations de concentration calcique intracellulaire au cours de la neurotransmission.

IX.2.1 Méthodologie

IX.2.1.a Capacité calcique mitochondriale

La capacité de rétention calcique représente la quantité de Ca^{2+} nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du PTP, normalement très finement réglée ; la concentration du Ca^{2+} matriciel est l'inducteur le plus puissant du PTP. La capacité de rétention calcique mitochondriale peut être mesurée sur des mitochondries isolées, à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence. En alternative, la dynamique des courants calciques peut être mesurée *in cellulo* en utilisant des microscopes confocaux doués des chambres thermostatées.

Au cours du développement de ce projet de recherche j'ai surtout travaillé sur les préparations purifiées de mitochondries. En ce qui concerne les mitochondries isolées, la dynamique de 'uploading', stockage, du Ca^{2+} , et l'ouverture du pore sont suivies en utilisant des sondes fluorescentes, comme le Fura 6 ($\lambda_{\text{excitation}} = 340/380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} =$

510 nm) ou le Calcium Green ($\lambda_{\text{excitation}} = 506 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 536 \text{ nm}$). Ces sondes restent à l'extérieur de la mitochondrie.

Afin d'effectuer des mesures dynamiques, du Ca^{2+} est ajouté, à doses et à intervalles de temps réguliers, au milieu de l'essai contenant la suspension mitochondriale et la sonde fluorescente.

Dans le cas du Calcium Green, la fluorescence augmente lorsque, au moment de l'ajout, le Ca^{2+} se lie à la sonde. Dans le cas du Fura 6, deux longueurs d'onde différentes sont utilisées pour exciter la fluorescence de la sonde, lorsqu'elle est libre ou liée au cation, et les émissions des fluorescence respectives sont mesurées en même temps par fluorimétrie. Le logiciel spécifique permet de calculer à chaque instant le rapport entre les valeurs des deux spectres d'émission ; la méthode Fura 6 est donc définie 'ratiométrique'. Elle permet des mesures précises de la quantité de Ca^{2+} présent dans le milieu. De façon analogue à ce qu'on a dit pour le Calcium Green, la valeur du *ratio* reportée par le logiciel est accrue lorsque la sonde se lie au Ca^{2+} ajouté au milieu de mesure (Fig. 64).

L'utilisation de ces sondes permet de visualiser l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie, lorsque la fluorescence diminue, et le relargage du cation, lorsque la capacité mitochondriale de rétention calcique est saturée.

La capacité calcique des mitochondries isolées du cerveau des souris transgéniques pour une forme mutée de SOD1 (SOD1-G93A) et leurs contrôles (étude 1) a été déterminée dans 1,9 ml de tampon 125 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM KH_2PO_4 , 2mM MgCl_2 , 5mM succinate, 1 μM roténone and 0.2 mM ADP, with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oligomycin and 0.3 μM Fura 6. L'utilisation de cyclosporine A (CsA, 0,5 μM), inhibiteur de référence du PTP, augmente la capacité de rétention des mitochondries.

Les mitochondries isolées à partir de cerveau sont incubées en présence de Fura 6, puis du Ca^{2+} (10 μM) est ajouté toutes les deux minutes. La capacité de rétention calcique est exprimée en nmol de Ca^{2+} nécessaire à l'ouverture du pore par mg de protéines mitochondriales.

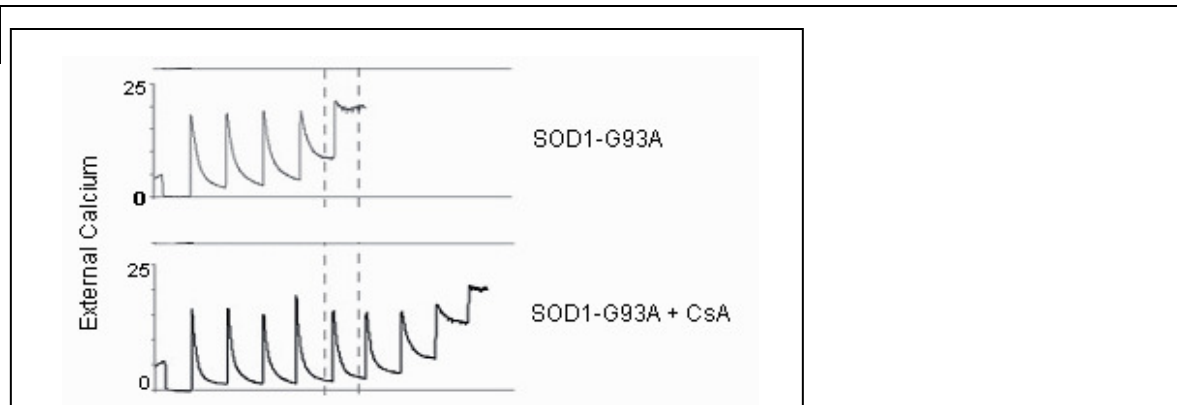


Figure 64 (modifiée d'après Damiano M *et al.*, 2006). Exemples de courbes représentatives de la capacité de stockage du Ca^{2+} des mitochondries de cerveau isolées à partir des souris transgéniques (SOD1-G93A). L'amélioration de la capacité calique mitochondriale est obtenue après ajout de CsA (inhibiteur du PTP) au milieu de mesure. La mesure par fluorimétrie de ce paramètre implique l'utilisation de sondes à fluorescence, dans ce cas le fura 6. La fluorescence dans le milieu de mesure augmente lorsque des petites quantités de Ca^{2+} y sont ajoutées à intervalles réguliers (les pics dans le graph.), et diminue graduellement lorsque le Ca^{2+} rentre dans la mitochondries grâce à l'action de plusieurs systèmes (l'uniporteur du calcium et les échangeurs $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$). Pour la mesure de la capacité calcique on calcule le rapport entre la quantité de Ca^{2+} ajoutée (somme des petites ajoutés) et le protéines contenues dans la préparation.

IX.2.2 Discussion

Les résultats obtenus au cours de ce projet montrent que la dysfonction mitochondriale précède l'apparition du phénotype pathologique dans les modèles de Sclérose Latérale Amyotrophique analysés. Dans le modèle G93A, nous démontrons la spécificité du défaut de capacité calcique mitochondriale pour les tissus nerveux, cerveau et moelle épinière, et sa relation avec d'autres défauts bioénergétiques, tels que le potentiel de membrane mitochondriale $\Delta\Psi_m$, la respiration et la synthèse de l'ATP.

Les résultats concernant un deuxième modèle, les souris transgéniques pour la forme mutée G85R de la SOD1, révèlent un défaut de capacité calcique mitochondriale dans la moelle épinière en absence de dysfonction d'autres paramètres de la phosphorylation oxydative, ce qui indique l'importance que cette fonction revête dans la physiologie neuronale.

Un autre résultat qui émerge de ce projet et qui mérite un commentaire est le constat que la capacité calcique des mitochondries isolées à partir du cerveau du modèle G93A présente de variations liées à l'âge, dans le sens d'une amélioration au cours du vieillissement. Cette augmentation de la capacité calcique dans les souris transgéniques à des âges avancées pourrait être la conséquence de changements en composition cellulaire observés dans le cerveau de ce modèle au cours de la progression de la maladie. La prolifération gliale devient importante à des stades tardifs. Ainsi, les défauts mitochondriaux pourraient affecter les divers types cellulaires en différents degrés. Compte tenu de nos observations, une spéculation possible est que la spécificité cellulaire des défauts mitochondriaux est centrale à l'initiation du processus de neurodégénérescence, sa progression étant plutôt liée à la combinaison de phénomènes 'cell-autonomous' et 'non cell-autonomous'. Plusieurs travaux ont effectivement exploré ces aspects dans la SLA (Boillée S *et al.*, 2006 ; revu dans Ilieva H *et al.*, 2009).

IX.1 Articles 3 et 4



Tissue- and Cell-Specific Mitochondrial Defect in Parkin-Deficient Mice

Maria Damiano^{1,2,3,9}, Clément A. Gautier^{1,2,3,9}, Anne-Laure Bulteau^{4,5,6}, Rosa Ferrando-Miguel^{1,2,3}, Caroline Gouarne⁷, Marc Giraudon Paoli⁷, Rebecca Pruss⁷, Françoise Auchère⁸, Caroline L'Hermitte-Stead^{4,5,6}, Frédéric Bouillaud^{4,5,6}, Alexis Brice^{1,2,3,9}, Olga Corti^{1,2,3}¶, Anne Lombès^{4,5,6*}¶

1 Inserm, U 975, CRICM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France, **2** UPMC Université Paris 06, UMR_S975, Paris, France, **3** CNRS, UMR 7225, Paris, France, **4** Inserm U 1016, Institut Cochin, Paris, France, **5** CNRS UMR 8104, Paris, France, **6** Université Paris 05, UMR_S1016, Paris, France, **7** Trophos, SA Parc Scientifique de Luminy Case, Marseille, France, **8** Laboratoire Mitochondries, Métaux et Stress Oxydatif, Département de Pathologie Moléculaire et Cellulaire, Institut Jacques Monod, Université Paris-Diderot/CNRS, Paris, France, **9** AP-HP, Hôpital de la Salpêtrière, Department of Genetics and Cytogenetics, Paris, France

Abstract

Loss of Parkin, encoded by *PARK2* gene, is a major cause of autosomal recessive Parkinson's disease. In Drosophila and mammalian cell models Parkin has been shown to play a role in various processes essential to maintenance of mitochondrial quality, including mitochondrial dynamics, biogenesis and degradation. However, the relevance of altered mitochondrial quality control mechanisms to neuronal survival *in vivo* is still under debate. We addressed this issue in the brain of *PARK2*^{-/-} mice using an integrated mitochondrial evaluation, including analysis of respiration by polarography or by fluorescence, respiratory complexes activity by spectrophotometric assays, mitochondrial membrane potential by rhodamine 123 fluorescence, mitochondrial DNA content by real time PCR, and oxidative stress by total glutathione measurement, proteasome activity, *SOD2* expression and proteins oxidative damage. Respiration rates were lowered in *PARK2*^{-/-} brain with high resolution but not standard respirometry. This defect was specific to the striatum, where it was prominent in neurons but less severe in astrocytes. It was present in primary embryonic cells and did not worsen *in vivo* from 9 to 24 months of age. It was not associated with any respiratory complex defect, including complex I. Mitochondrial inner membrane potential in *PARK2*^{-/-} mice was similar to that of wild-type mice but showed increased sensitivity to uncoupling with ageing in striatum. The presence of oxidative stress was suggested in the striatum by increased mitochondrial glutathione content and oxidative adducts but normal proteasome activity showed efficient compensation. *SOD2* expression was increased only in the striatum of *PARK2*^{-/-} mice at 24 months of age. Altogether our results show a tissue-specific mitochondrial defect, present early in life of *PARK2*^{-/-} mice, mildly affecting respiration, without prominent impact on mitochondrial membrane potential, whose underlying mechanisms remain to be elucidated, as complex I defect and prominent oxidative damage were ruled out.

Citation: Damiano M, Gautier CA, Bulteau A-L, Ferrando-Miguel R, Gouarne C, et al. (2014) Tissue- and Cell-Specific Mitochondrial Defect in Parkin-Deficient Mice. PLOS ONE 9(6): e99898. doi:10.1371/journal.pone.0099898

Editor: Maria Moran, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Spain

Received: December 13, 2013; **Accepted:** May 20, 2014; **Published:** June 24, 2014

Copyright: © 2014 Damiano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Institut national de la santé et de la recherche médicale, Association France Parkinson, Fondation de France, Agence Nationale de la Recherche, MEFOPA (funded by the EU 7th Framework Programme, Grant Agreement HEALTH-2009-241791), Fondation ICM, "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06. CG was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: CG & RP are employees of Trophos. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: anne.lombes@inserm.fr

¶ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Mitochondrial dysfunction has long been thought to play a key role in Parkinson's disease (PD) pathogenesis. Parkinsonian syndromes are induced in humans and animals by complex I inhibitors, such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or rotenone, and complex I activity has been reported to be reduced in different tissues from patients, suggesting that this defect may contribute to neuronal degeneration in PD [1,2]. Mitochondrial dysfunction has also been suggested to contribute to oxidative damage and apoptosis in idiopathic PD brains [3]. Identification of genetic causes of familial PD reinforced a central role for mitochondria in PD pathogenesis [4,5]. Indeed most autosomal recessive forms were found to be caused by the

alteration of a gene encoding a protein localized to mitochondria, either in particular contexts, as in the case of Parkin [6] and DJ-1 [7], or constitutively for PINK1 [8]. Furthermore, studies in various models and from many independent laboratories have provided evidence for interaction between the *PARK2* and *PINK1* genes and their protein products in a common pathway centered on maintenance of mitochondrial quality [9]. In cell models Parkin and PINK1 regulate the elimination of dysfunctional mitochondria through mitophagy [10–15]. Parkin and PINK1 have also been involved in mitochondrial fission and fusion [16–18], mitochondrial transport [19,20], and mitochondrial biogenesis [21,22], processes that are also relevant to mitochondrial quality. Consistent with these findings, *PARK2* or *PINK1* inactivation have been reproducibly linked with partial mitochondrial depolariza-

tion [23–25], reduced respiration rates [22,24,26,27] and/or reduction in the enzymatic activity of complex I of the mitochondrial electron transport chain [24–30].

However, the *in vivo* relevance of the PINK1/Parkin-dependent mitochondrial quality control mechanisms for neuronal cells has recently been questioned [31,32]. In addition, PINK1- or Parkin-deficient mouse models have less consistently shown mitochondrial defects than cellular models, possibly due to differences in the ages and tissues examined and in the methodologies used [26,33–37]. Several groups, including ours, have generated Parkin-deficient mice and shown that, in general, they do not present with overt signs of neuronal degeneration in the nigrostriatal pathway, even at high ages [38–42]. In some cases, including our model, moderate alterations in dopamine handling evocative of presymptomatic changes have been reported in the striatum, such as increased extracellular dopamine content, enhanced dopamine metabolism via monoamine oxidase and decreased motor activation following amphetamine-induced dopamine-release [38,39]. Therefore, despite the lack of manifest parkinsonian phenotype, these mice may be valuable for investigation of early disease-related modifications and compensatory mechanisms. To clarify discrepancies in the literature regarding the role of mitochondrial dysfunction in these models [35,37], we have investigated mitochondrial functions, including respiration, respiratory complexes activity and inner membrane potential, in mice carrying a germline homozygous deletion of *PARK2* exon 3 [39].

To address potential technical biases underlying the literature discrepancies, we analyzed respiration in different mitochondrial and tissue preparations, including crude mitochondrial pellets from striatum and cortex, purified mitochondria from whole brain, and post-nuclear supernatants from midbrain and striatum; we also examined primary embryonic neurons and astrocytes from striatum or cortex. We provide evidence for tissue- and cell-type-specific reduction of mitochondrial respiratory capacity in *PARK2*^{-/-} mice. These defects were observed in the absence of overt oxidative damage, decreased mitochondrial membrane potential or defective enzymatic activities of the respiratory chain complexes, thus leaving open their underlying mechanisms.

Materials and Methods

Ethics statement

All experiments were approved by the “Comité d’Ethique pour l’expérimentation animale Charles Darwin” (Ce5/2009/052).

Generation of experimental groups

PARK2^{-/-} mice were generated and brought into the C56Bl/6j genetic background as previously described [39,42]. Experimental groups of age-matched littermate *PARK2*^{-/-} and wild type mice were generated by intercross of heterozygous *PARK2*^{-/+} mice. Genotypes were determined by PCR amplification [42]. After weaning, male and female mice were separated and maintained at a maximum of five littermates per cage, with food and water ad libitum, and at constant temperature (20°C+/-2°C) with a 08:00–18:00 light cycle. The experiments were performed on female mice (n = 42 per genotype) as follows, with n corresponding to the number of animals per genotype, 24-month-old mice were used for respiration analyses on crude mitochondrial pellets (n = 8), purified mitochondrial pellets (n = 2) or post-nuclear supernatants (n = 8), and oxidative stress evaluation with glutathione and proteasome studies (n = 5), 9-month-old mice for respiration analyses on post-nuclear supernatants (n = 7), 12-month-old mice for respiratory chain complexes assays (n = 7), and oxidative stress evaluation with glutathione and proteasome studies (n = 5). For all

applications, mice were killed by decapitation, without prior anesthesia.

Tissue preparation

After mice decapitation, liver and brain were rapidly removed and the regions of interest dissected on ice. All samples were manually homogenized using a Dounce homogenizer with a Teflon pestle. The scheme depicting the different tissue preparations and their use is shown in Figure S1.

Crude mitochondrial pellets from the striatum or cortex were obtained by homogenization in 9 volumes of Buffer A (50 mM Tris HCl, 5 mM Glucose, 1 mM Pyruvate, 1 mM EGTA, 150 mM KCl, pH 7.5). Centrifugation for 5 min at 1000 g gave post-nuclear supernatant. The nuclei and tissue particles in the pellet was subjected to a second identical cycle of homogenization and centrifugation. The two post-nuclear supernatants were collected and centrifuged for 10 min at 10,000 g to obtain the crude mitochondrial pellet that was diluted in 120 and 240 µl of Buffer A for striatal and cortical mitochondria respectively. These suspensions were used for respiration and protein assay. Between 5 and 10 µg mitochondrial proteins were used per run of respiration.

Purified brain mitochondria were obtained by homogenization of a whole brain in 1 mL Mannitol-Sucrose (MS) isolation medium (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 0.1 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (FAF-BSA) [43]. The homogenate volume was brought to 1.5 ml. The supernatant of a first centrifugation during 6 min at 500 g was centrifuged during 10 min at 14 000 g to obtain the crude mitochondrial pellet that was diluted in 200 µl of 12% Percoll solution in MS buffer, layered on top of a discontinuous Percoll gradient (200 µl of 12% Percoll on top of 1 mL of 24% Percoll in MS buffer), and centrifuged during 18 min at 17 000 g. The resulting mitochondrial pellet was washed twice with MS buffer with centrifugation during 7 min at 17 000 g the first time and during 5 min at 14 000 g the second time. The last purified mitochondrial pellet was diluted in 100 µl MS buffer and used for respiration (5 µg of mitochondrial proteins per run) and protein assays.

Liver, ventral midbrain and striatal post-nuclear supernatants were obtained by homogenization in 9 volumes of 300 mM sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM Tris HCl pH 7.4, followed by centrifugation during 10 minutes at 1000 g. The post-nuclear supernatants were directly used for respiration and protein assays, as well as for the analysis of inner mitochondrial membrane potential. Each run of respiration assay used 300 µg of protein of post-nuclear supernatant from midbrain or striatum and 1 mg from liver.

Primary striatal or cortical neurons were prepared at embryonic day 16 by a method adapted from Friedman et al [44]. In summary, following centrifugation through a BSA cushion, primary neurons were seeded onto poly-ornithine and laminin coated Seahorse 24-well plates (175,000 cells/well for striatal neurons and 140,000 cells/well for cortical neurons) and cultured for 7 days at 37°C, 5% CO₂ in Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1 mM sodium pyruvate and 1 mM glutamax.

Astrocytes were isolated from striatum or cortex of newborn mice as previously described [45] and cultured in poly L-lysine coated tissue culture flasks (75 cm²) for 7 days. Astrocytes were then trypsinized, plated in Seahorse 24-well plates (40,000 cells/well) and cultured for another 4 days at 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco’s modified Eagle’s medium F12 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin streptomycin.

Respiration assays

For mitochondrial preparations or post-nuclear supernatants, the rate of oxygen consumption was measured in a Clark-type electrode. Mitochondrial pellets were analyzed by classical respirometry using Hansatech electrode (Cambridge, UK). The respiration medium was 100 mM KMES, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 3 mM EDTA, 0.4% w/v FAF-BSA, pH 7.4 for crude mitochondrial pellets. It was 125 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 200 μM EGTA, 0.2% w/v FAF-BSA, pH 7.4 for purified mitochondria. Post-nuclear supernatants were analyzed by high resolution respirometry with an Oroboros apparatus (Innsbruck, Austria) using 100 mM KCl, 40 mM sucrose, 10 mM TES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.4% w/v FAF-BSA, pH = 7.2 as respiration medium.

Common recorded parameters were the respiration rate in the presence of 10 mM glutamate, 5 mM malate and 1 mM ADP, in the presence of 1 μg/mL oligomycin, a complex V inhibitor, and in the presence of 1 mM KCN (= non-respiratory oxygen consumption). These parameters allowed the calculation of state 3 respiration = respiration in the presence of substrates+ADP - non-respiratory oxygen consumption, state 4 respiration = respiration in the presence of oligomycin - non-respiratory oxygen consumption, and respiratory control ratio = state 3/state 4, evaluating the efficiency of the oxidative phosphorylation coupling. Two additional parameters were recorded with Oroboros electrode: basal respiration (in the presence of substrates before ADP addition) and maximal respiration rate (maximal rate obtained by progressive additions of 1.25 μM carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (cccp), a protonophore dissipating the inner membrane potential, performed after the step with addition of oligomycin). These additional parameters were used to calculate the respiratory reserve = maximal respiration - basal respiration.

For primary neurons and astrocytes, respiration was analyzed in a XF24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience) in the presence of 25 mM glucose [46]. Subsequent steps included complex V inhibition by oligomycin, inner membrane potential dissipation by tri-fluorocarbonyl cyanide phenylhydrazone (fcp), and respiration inhibition by rotenone and antimycin, complex I and complex III inhibitors respectively. For each cell type, preliminary experiments determined the concentration of these agents to optimally inhibit or stimulate respiration without inducing toxicity (as mentioned in the figure legend). To measure the relative cell density and viability in each well after respiration measurements, cells were incubated during 20 minutes with 2 μg/ml calcein-AM, a cell-permeant fluorogenic esterase substrate whose fluorescence emission was measured at 532 nm, with excitation set at 650 nm. For astrocytes, calcein global fluorescence was not proportional to cell number seeded, so the non-mitochondrial OCR, which measures non mitochondrial oxidase activity, was used to control for cell density equivalence. Cells from wild type and *PARK2*^{-/-} mice were seeded in different wells of the same plate and only experiments with similar cell densities were used for analysis. The recorded parameters were initial respiration, state 4 respiration rate (respiration under oligomycin inhibition minus non-respiratory oxygen consumption under rotenone and antimycin) and maximal respiratory rate (respiration under fcp minus non-respiratory oxygen consumption). The initial respiration rate slightly differs from the basal respiration recorded with mitochondrial pellets or post-nuclear supernatants because ADP level cannot be controlled in intact cells. The difference between maximal and initial respiration was thus named spare respiratory capacity instead of respiratory reserve. Coupling efficiency was evaluated by the ratio between initial respiration rate and

respiration under oligomycin (both after subtraction of the non-respiratory oxygen consumption).

Mitochondrial activities

The maximal velocity of respiratory complexes and citrate synthase activities was evaluated using standardized spectrophotometric assays used in the diagnosis of human mitochondrial diseases [47] while complex V activity was assayed using the ATP hydrolysis assay [48].

Determination of the mitochondrial transmembrane potential

The mitochondrial membrane potential was evaluated in post-nuclear supernatants using the fluorescent probe rhodamine 123, which accumulates in the mitochondrial compartment according to the Nernst law [49]. Incubation was performed at room temperature with 2 to 5 μg protein of post-nuclear supernatants/mL of respiration medium with 250 nM rhodamine 123, and in diverse bioenergetic conditions: condition A = substrates (10 mM glutamate+5 mM malate), condition B = A+1 mM ADP, condition C = B+1 μM oligomycin, condition D = C+1 μM cccp, condition E = C+2 μM cccp, condition F = C+4 μM cccp, condition G = C+8 μM cccp, condition H = C+10 μM cccp and 1 mM KCN. Reading was performed with an Accuri flow cytometer. Results were expressed in mV as calculated by Nernst equation after normalization of the fluorescence to the size of the objects as measured by their forward scatter, taking into account the proportion of mitochondrial objects (% of energizable objects upon maximal energization), evaluating the mitochondrial volume in the optic chamber of Accuri flow cytometer (estimated for brain at 3% of the volume analyzed), and using condition H for evaluation of the zero fluorescence.

Quantification of mitochondrial DNA

Quantification of mitochondrial DNA was performed in striatum by quantitative real time PCR using as standard a plasmid with the murine mitochondrial DNA-encoded *MT-CO2* gene as an insert [50]. Results were expressed as copy number of mitochondrial DNA/10 pg of total DNA, which roughly represent a normal diploid genome.

Determination of cytosolic and mitochondrial glutathione levels

Total glutathione levels were determined using 20 μg proteins of crude mitochondrial pellet or cytosol from striatum and midbrain with a modified version of the recycling enzymatic assay based on the reduction of each GSSG molecule to give two GSH molecules [51]. Standard curves were obtained with various concentrations of GSSG and the values were thus expressed as GSSG equivalent. Total glutathione content therefore equals 0.5 GSH+GSSG and is expressed in nmoles of glutathione/mg of protein.

20S proteasome peptidase activity

The chymotrypsin-like activity of the proteasome was assayed in cytosol from striatum and midbrain with the fluorogenic peptide succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-amidomethylcoumarin (LLVY-AMC) as substrate. 20 μg cytosolic proteins were incubated with 12.5 μM substrate in 25 mM Tris, pH 7.5 in a final volume of 200 μl [52]. Enzymatic kinetics was monitored in a temperature-controlled microplate fluorimetric reader (Fluostar Galaxy; BMG, Stuttgart, Germany). Excitation/emission wavelengths were 350 nm/440 nm.

Western blot analyses

30 μ g of proteins of crude mitochondrial pellets from striatum or midbrain were solubilized overnight at room temperature in sample buffer at a SDS/protein ratio = 30. Proteins were separated by electrophoresis in 4–20% pre-cast gradient gels (Biorad, Hertfordshire, UK) and transferred on nitrocellulose membrane (Protran Whatman, Dassel, Germany). Antibodies were rabbit polyclonal anti-SOD2 from Sigma and anti-nitrotyrosine from Molecular Probes, mouse monoclonal anti-VDAC from Mitoscience and rabbit anti-4-hydroxynonenal (HNE) produced in the team [52]; they were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK).

Statistical methods

Statistics were performed with SigmaPlot 12.5 software. Non parametric tests were used unless the data were shown to have a normal distribution allowing the use of parametric tests. The numbers given indicate independent measurements. Animals were not pooled but always individually evaluated. Mean comparisons were performed with Mann and Whitney test or unpaired Student t test while paired comparisons were done by the Wilcoxon signed-rank test or paired Student t test. Multiple comparison with the Holm-Sidak test was used after verification of equal variance to address the relative influence of age, genotype and their interaction.

Results

High resolution respirometry and cell-type specific analysis detect a respiration defect in *PARK2*^{-/-} mice

Reductions in uncoupled respiratory rates have previously been observed in the striatum or the substantia nigra of *PARK2*^{-/-} mice by two independent groups, with however partial inconsistency with respect to the associated state 3 and state 4 respiration rates [35,37]. Both reports relied on the analysis with standard oxygraphy of relatively crude mitochondrial pellets obtained by two successive centrifugation steps. Under these conditions, the observed respiratory control ratios (state 3/state 4 respiration) were low (below 3.5), reflecting relatively poor coupling of the electron transport chain with ATP synthesis [35,37].

We performed similar experiments in aged mice considering that they were more likely to express a defect because of the lack of neurodegenerative phenotype in *PARK2*^{-/-} mice [35,39,41] and the relationship of PD with ageing. Crude mitochondrial pellets from striatum and cortex were prepared from the brain of 24-month-old mice (Figure S1). State 3 and state 4 respiration as well as the respiratory control ratio were similar in *PARK2*^{-/-} and wild type mice (Figure 1A, B, C). As in the previous studies, the respiratory control ratios were relatively low (Figure S2).

Considering that mild respiration defects might not be detectable in crude mitochondrial pellets we next prepared whole brain purified mitochondria from 24-month-old mice and found similar state 3 and state 4 respiration as well as respiratory control in *PARK2*^{-/-} and wild-type mice (Figure 1D). Although mitochondrial enrichment of the preparation was shown by the higher specific respiratory rates as compared to those of crude mitochondrial pellets, the respiratory control ratio of these purified mitochondria was only slightly increased (Figure S2). Considering the need to use whole brain instead of specific brain region, the improvement of respiratory control ratio did not appear sufficient to pursue that procedure in a higher number of animals.

Furthermore we reasoned that altered mitochondria were likely to be eliminated during mitochondrial purification. That proce-

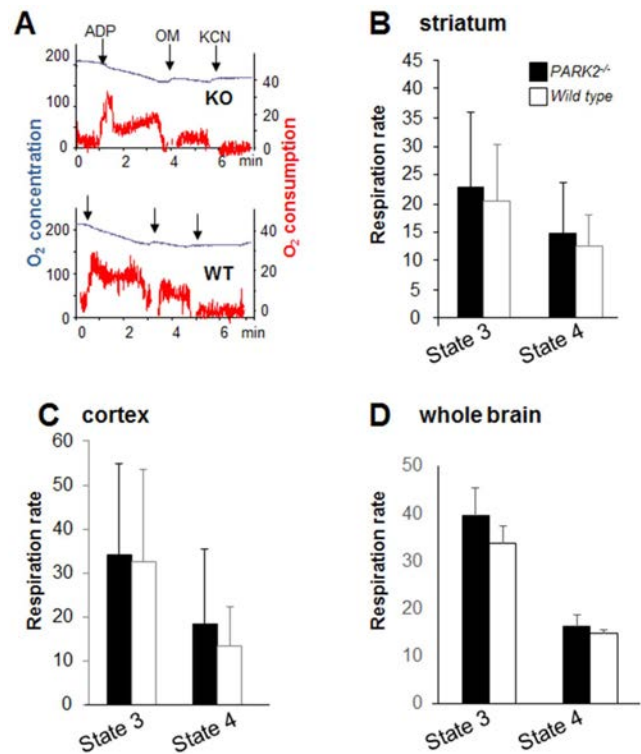


Figure 1. Respiration was similar in brain mitochondrial preparations from 24-month-old *PARK2*^{-/-} and wild type mice examined with standard oxygraphy. (A) Representative experiment with a crude mitochondrial pellet from striatum. Blue curve = oxygen (O_2) concentration expressed as nmol/mL; red curve = rate of oxygen consumption expressed as nmoles O_2 /mL and min; ADP = addition of 400 μ M ADP; OM = addition of 1 μ g/mL oligomycin, a complex V inhibitor; KCN = addition of 1 mM KCN (non-respiratory oxygen consumption); (B, C, D) Bars showing state 3 respiration (respiration in the presence of substrates +ADP – non-respiratory oxygen consumption) and state 4 respiration (respiration in the presence of oligomycin – non-respiratory oxygen consumption) on complex I substrates (glutamate+malate); black bars = *PARK2*^{-/-}, white bars = wild type; data are expressed as nmoles O_2 /mL and mg proteins and are shown as means \pm SD; two animals, one per genotype, were analyzed the same day; the numbers between brackets indicate the number of individual animals of each genotype; (B) results from crude mitochondrial pellets from striatum (n=6), (C) crude mitochondrial pellets from cortex (n=7) and (D) purified mitochondria from whole brain (n=2). doi:10.1371/journal.pone.0099898.g001

dures might thus be inappropriate when addressing mitochondrial quality control as is the case in the absence of Parkin. Very low respiration rates such as those observed without mitochondrial enrichment can only be analyzed with high resolution respirometry using Oroboros technology. We therefore optimized this technique for the analysis of post-nuclear supernatants. The relative rapidity of this tissue preparation allowed the parallel study of striatum, midbrain and liver from each mouse. With this method the respiratory control ratios were above 10 in midbrain and striatum, indicating excellent mitochondrial preservation. These ratios were similar between *PARK2*^{-/-} and wild type mice (Figure S2). An example of curve obtained with 300 μ g striatum post-nuclear supernatant is shown in Figure 2A. 24-month-old *PARK2*^{-/-} mice showed significant decreased respiratory reserve in striatum when compared to wild type mice ($p=0.028$ using Mann and Whitney test). The concomitant decrease of state 3 respiration in striatum just failed to reach significance ($p=0.06$

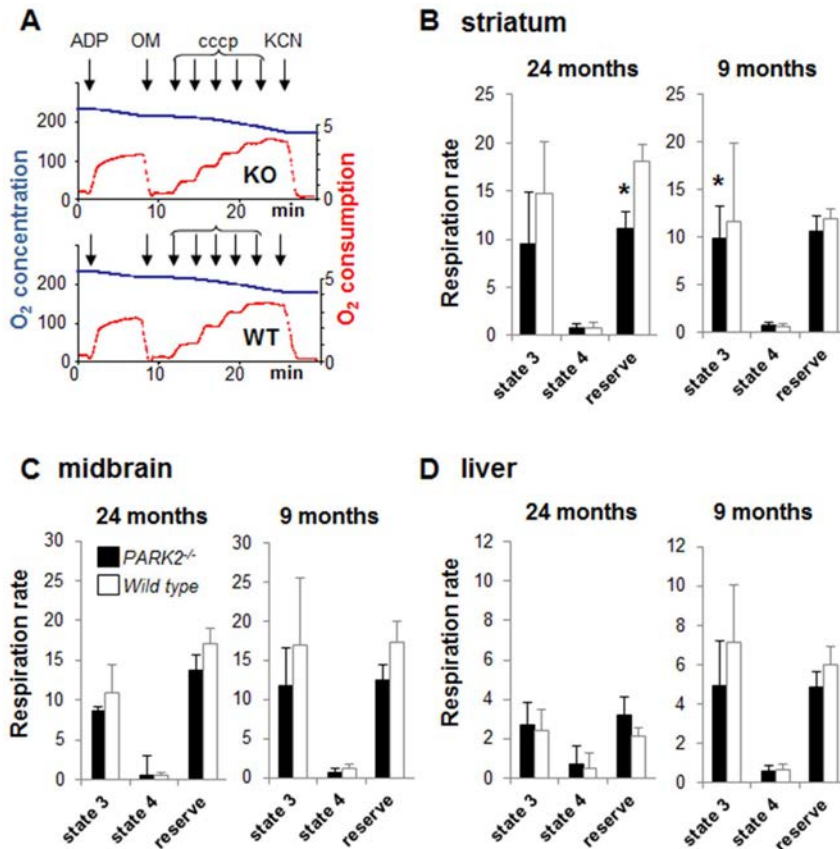


Figure 2. High resolution respirometry reveals a respiration defect in *PARK2*^{-/-} mice. (A) Representative experiment with striatal post-nuclear supernatant. Blue curve = oxygen concentration (O₂) expressed as nmol/mL; red curve = rate of oxygen consumption expressed as nmoles O₂/mL and min; successive additions: ADP = 1 mM ADP in the medium with 10 mM glutamate + 5 mM malate; OM = 1 μg/mL oligomycin, cccp = successive additions of 1.25 μM (up to the maximal respiration rate independent from ATP synthase capacity); KCN = 1 mM KCN (non-respiratory oxygen consumption); (B, C, D) Bars showing state 3 respiration, state 4 respiration and respiratory reserve on complex I substrates (glutamate + malate) in post-nuclear supernatants from (B) striatum, (C) midbrain and (D) liver of 24- and 9-month-old *PARK2*^{-/-} (black bars) and wild type mice (white bars); all data are expressed as nmoles O₂/mL and mg proteins and shown as means ± SD; two animals, one per genotype, were analyzed the same day; the data were obtained from 6 to 8 individual animals of each genotype. * *p* < 0.05 using Mann and Whitney test. In liver, state 3 respiration rate and respiratory reserve significantly decreased with age in both wild type mice (*p* = 0.011 and < 0.001 when comparing state 3 respiration and respiratory reserve respectively between 9 and 24 months of age using Mann and Whitney test) and in *PARK2*^{-/-} mice (*p* = 0.019 and < 0.001 when comparing state 3 respiration and respiratory reserve respectively between 9 and 24 months of age using Mann and Whitney test). doi:10.1371/journal.pone.0099898.g002

with Mann and Whitney test) (Figure 2B). State 4 respiration was not affected. The decreased state 3 respiration and respiratory reserve in midbrain did not reach significance (Figure 2C) and liver respiration was similar in both genotypes (Figure 2D).

Using the same approach we then studied younger mice at 9 months of age to address the presence of the respiratory defect earlier in life. *PARK2*^{-/-} mice presented with a decrease in state 3 respiration rate and respiratory reserve in midbrain and striatum that was similar to the pattern observed in aged mice (Figure 2B). As previously observed in aged mice, the decrease was only significant in the striatum (*p* = 0.05 for state 3 respiration with Mann and Whitney test).

Liver showed a significant age-associated decrease in respiratory reserve capacity in both genotypes (Figure 2D). In contrast the respiratory capacity in striatum and midbrain post-nuclear supernatants was not modified by age.

Even precisely limited brain regions contain distinct cell populations, which essentially are astrocytes and neurons. These cells present with strikingly different energetic metabolism and thus may develop different responses to the absence of Parkin [53]. Using Seahorse technology to evaluate the respiration of cultured

cells in multi-wells plates, we addressed this question by comparing *PARK2*^{-/-} and wild type pure primary embryonic neurons or neonatal astrocytes from striatum or cortex (Figure 3). In striatal neurons, the maximal respiration rate and spare respiratory capacity were significantly reduced in the absence of Parkin. In contrast they were similar in *PARK2*^{-/-} and wild type cortical neurons. Astrocytes strikingly differed from neurons with respect to their uncoupled maximal respiration, which was equal or often lower than their initial respiration. As a result, their spare respiratory capacity appeared null or negative. This observation contrasted with previously reported maximal respiration rates in astrocytes that were at least two-fold higher than basal respiration using Seahorse protocols without the step of oligomycin inhibition [54,55]. We thus considered that our protocol was not suitable for reliable evaluation of maximal respiration and only analyzed initial respiration of astrocytes, which appeared mildly reduced in *PARK2*^{-/-} striatum and normal in cortex.

At the end of these diverse analyses of respiration it could be concluded that the absence of parkin was associated with a mild but significant striatal respiratory defect that did not appear to worsen with age and was even detectable in embryonic neurons.

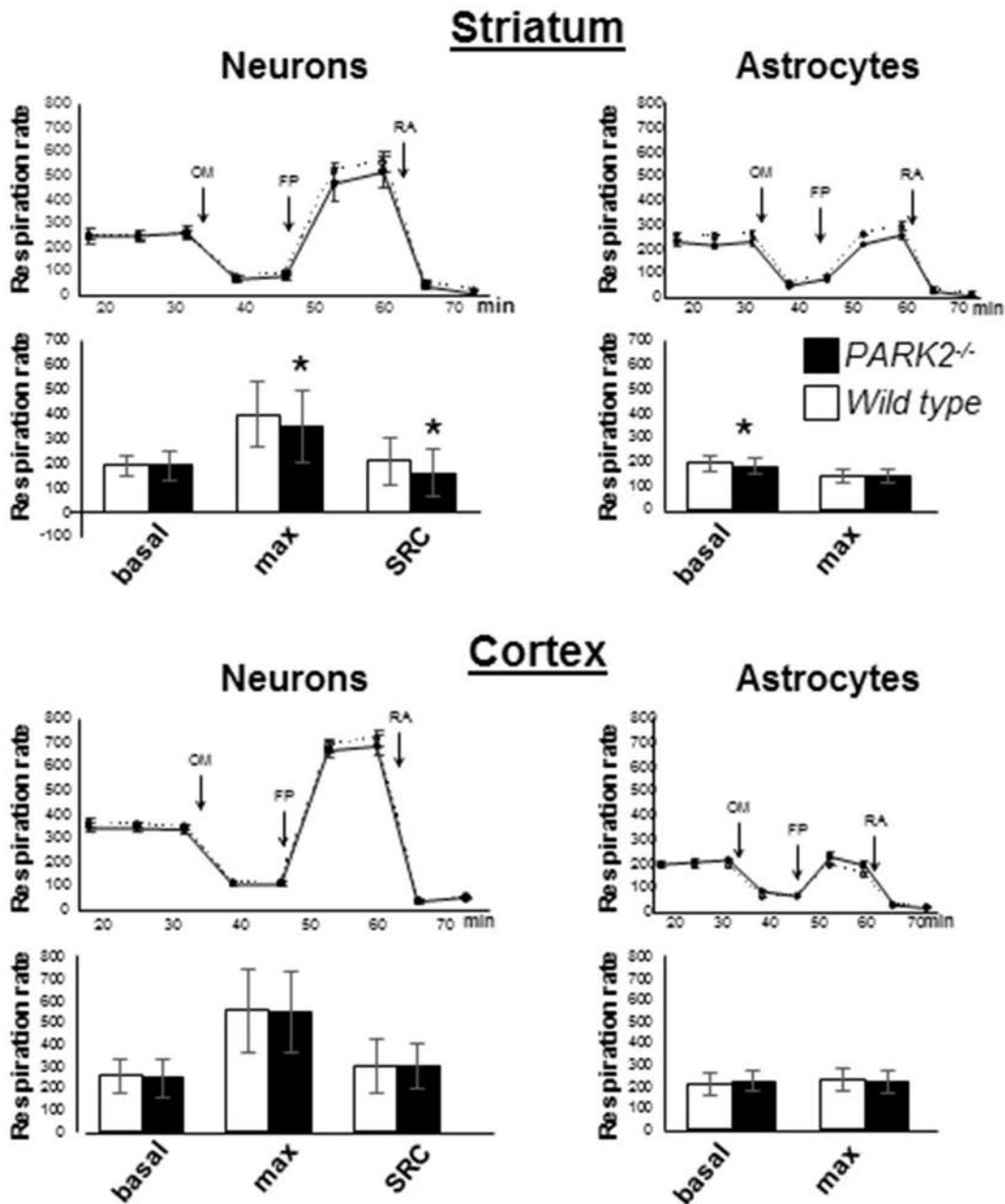


Figure 3. Maximal respiration is reduced in striatal neurons from *PARK2*^{-/-} mice. Representative experiments with neurons or astrocytes from striatum or cortex: the traces represent the evolution of the respiration rate (in pmol O₂/minute) in Seahorse plates seeded with cells from *PARK2*^{-/-} (black circles) and wild type (white circles) mice. Sequential additions are: oligomycin (OM) (0.25 μg/ml for neurons and 0.5 μg/ml for astrocytes), fccp (FP) (3 μM for cortical neurons and 1 μM for other cells), and rotenone+antimycin A (RA) (50 nM rotenone+150 μg/ml antimycin A). Bars below the traces show the means and SD of basal respiration, maximal respiration and spare respiratory capacity (SRC=maximal - basal respiration) of 3 independent tests, each performed in 6 to 12 independent wells. * *p*<0.05 using Mann and Whitney test. doi:10.1371/journal.pone.0099898.g003

Mitochondrial inner membrane potential of *PARK2*^{-/-} mice was normal but showed greater sensitivity to uncoupling with ageing in the striatum

Low inner membrane potential ($\Delta\psi_m$) is one of the expected consequences of a respiration defect. Furthermore it has been proposed to be an important signal for Parkin translocation to mitochondria and mitophagy [56]. To determine whether the absence of Parkin translates *in vivo* into the presence of depolarized mitochondria, we analyzed the $\Delta\psi_m$ in midbrain, striatum and

liver of *PARK2*^{-/-} and wild type mice, at 9 and 24 months of age (Figure 4). The reliability of the method was demonstrated in the three tissues by the significant decrease in $\Delta\psi_m$ upon ADP stimulation (condition B *versus* A, *p*<0.001 with Mann and Whitney test), its increase upon inhibition of the ATP synthase activity by oligomycin (condition C *versus* B, *p*<0.001), and decrease with addition of uncoupler above 1 μM (condition C *versus* E, F or G, *p*<0.001). The mean $\Delta\psi_m$ did not significantly differ between *PARK2*^{-/-} and wild type mice in any of the

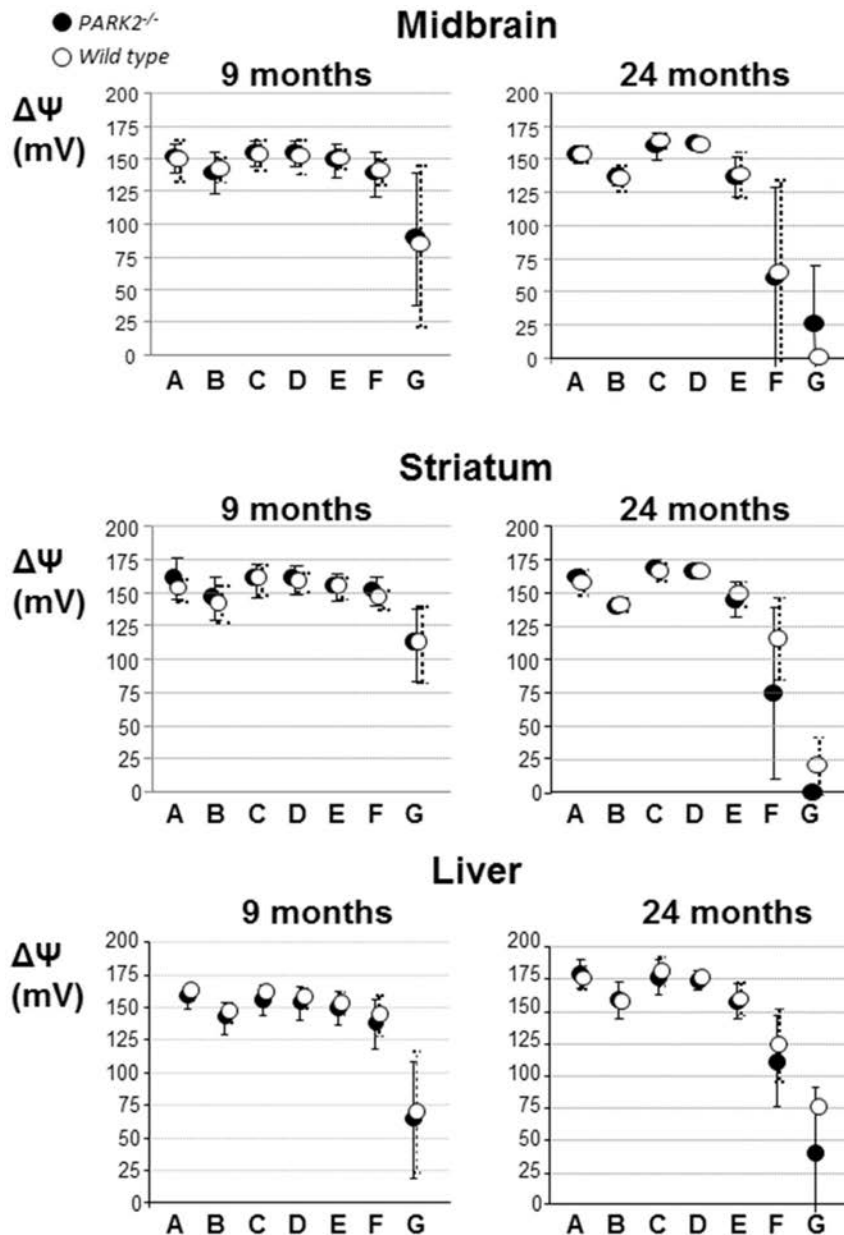


Figure 4. The inner mitochondrial membrane potential is normal in midbrain and striatum of *PARK2*^{-/-} mice. Dark circles = *PARK2*^{-/-}, white circles = wild type; $\Delta\Psi_m$ = inner mitochondrial membrane potential expressed as mV after transformation of the fluorescent rhodamine 123 signal using the Nernst equation, as explained in the methods section; A = $\Delta\Psi_m$ in the presence of glutamate+malate; B = A+1 mM ADP; C = B+1 μ M oligomycin; D = C+1 μ M cccp; E = C+2 μ M cccp; F = C+4 μ M cccp; G = C+8 μ M cccp. The data were obtained in parallel to the analysis of respiration; two animals, one per genotype, were analyzed the same day; the data obtained from seven 9-month-old mice and six 24-month-old ones of each genotype, they are expressed as mean and SD.
doi:10.1371/journal.pone.0099898.g004

conditions and tissues examined, excluding excessive accumulation of partially depolarized mitochondria in the absence of Parkin.

In both *PARK2*^{-/-} and wild type brain ageing had a clear impact on the $\Delta\Psi_m$ response to increasing doses of the uncoupler cccp with a significant drop of the mean $\Delta\Psi_m$ under 8 μ M cccp treatment from 9 to 24 months of age in the striatum and midbrain ($p = 0.022$ and 0.035 in midbrain and $p = 0.001$ and < 0.001 in striatum of *PARK2*^{-/-} and wild type mice respectively using Mann and Whitney test) (Figure 4). The mean $\Delta\Psi_m$ under the lower dose of 4 μ M cccp was only significantly lower with age in striatum ($p = 0.014$ and $p = 0.020$ in striatum of *PARK2*^{-/-} and

wild type mice respectively and $p = 0.181$ and 0.138 in midbrain). The drop of $\Delta\Psi_m$ between condition C (highest value under oligomycin) and condition F or G (uncoupled by either 4 or 8 μ M cccp) was then calculated for each mouse. In striatum and under 8 μ M cccp only, that drop was significantly higher in *PARK2*^{-/-} than in wild type mice ($p = 0.041$ with Mann and Whitney test).

In liver, despite a similar trend, the changes with age in the mean response of $\Delta\Psi_m$ to uncoupling did not reach significance in wild type or *PARK2*^{-/-} mice.

In conclusion the absence of Parkin did not significantly alter the mean $\Delta\Psi_m$ in midbrain, striatum and liver of *PARK2*^{-/-} mice

but it was associated in striatum with a greater impact of ageing on the $\Delta\psi_m$ response to uncoupling.

The respiratory defect in *PARK2*^{-/-} mice was not due to defective complex I activity, altered mitochondrial content or overt oxidative stress

Complex I activity has previously been reported to be lowered in cells from PD patients with *PARK2* mutations [25,29,30] and in a Parkin-depleted zebrafish model [57]. Such a defect may underlie the reduction in striatal tissue respiration and the increased sensitivity of $\Delta\psi_m$ to uncoupling in *PARK2*^{-/-} mice. To address this possibility, we used spectrophotometric methods recently standardized for the diagnosis of human mitochondrial diseases [47] to measure the respiratory chain activities in striatal post-nuclear supernatants and crude mitochondrial pellets of cortex and midbrain from one-year-old *PARK2*^{-/-} and wild type mice. All the respiratory chain activities examined were similar in *PARK2*^{-/-} and wild type mice (Table 1).

Citrate synthase, a citric acid cycle activity often used to evaluate mitochondrial content [58], was also normal in *PARK2*^{-/-}. In addition, cell mitochondrial DNA contents were similar in the striatum of *PARK2*^{-/-} and wild type mice, confirming that Parkin deficiency does not have an impact on mitochondrial content (1686 ± 119 copies/cell in *PARK2*^{-/-} mice versus 1791 ± 94 in wild type mice).

Post-translational modifications regulating the activity of mitochondrial proteins involved in the import, catabolism or oxidative phosphorylation of respiratory substrates could also underlie the respiration defect observed in *PARK2*^{-/-} mice. Previous studies have reported alterations in proteins involved in the defense against oxidative stress in these mice [35,36]. We therefore searched for evidence of oxidative stress in midbrain and striatum of *PARK2*^{-/-} mice. Ageing however being known to have significant influence on oxidative stress, we analyzed the combined influence of age and genotype on the parameters of oxidative stress using multiple comparison by the Holm-Sidak test. Proteasome activity significantly increased with age in striatum ($p < 0.001$) but not midbrain, without influence of the genotype (Table 2). Similarly the midbrain mitochondrial glutathione content increased with age ($p < 0.001$ when comparing 12-month-old to 24 month-old mice) without influence of the genotype). In contrast, significant interaction between age and genotype was observed for

the striatal mitochondrial glutathione content ($p = 0.015$). Ageing led to a significant increase in striatal mitochondrial glutathione in wild type mice ($p < 0.001$ when comparing 12-month-old to 24 month-old wild type mice) but had no effect in *PARK2*^{-/-} mice. At 12 months of age the striatal mitochondrial glutathione levels were significantly higher in *PARK2*^{-/-} mice than in wild type mice ($p < 0.011$ when comparing 12-month-old wild type to 12-month-old *PARK2*^{-/-} mice with Mann and Whitney test). Cytosolic glutathione levels did not change with age in midbrain. In striatum cytosolic glutathione levels significantly decreased with age ($p < 0.001$ when comparing 12-month-old to 24 month-old mice without influence of the genotype, Figure 5); interaction between age and genotype just failed to reach significance ($p = 0.056$).

In parallel nitrotyrosine (NT) and 4-hydroxynonenal (HNE), two different protein oxidative adducts, were searched for in crude mitochondrial pellets using western blot analysis. At 12 months of age there was a significant increase in both adducts in the striatum of *PARK2*^{-/-} compared to wild type mice ($p < 0.001$ and $p = 0.016$ for NT and HNE respectively with Mann and Whitney) (Figure 6). At 24 months of age, *PARK2*^{-/-} striatum showed increase in NT only ($p = 0.028$ compared with wild type mice) whereas wild-type mice showed an increase of HNE in midbrain ($p = 0.003$).

The steady-state of the mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2), normally increased in the presence of mitochondrial oxidative stress [59], was normal at 12 months of age and slightly increased at 24 months of age in *PARK2*^{-/-} mice compared to wild type mice ($p = 0.016$ using Mann and Whitney test) (Figure 7).

Altogether, our results show an increase in oxidative stress in the striatum mitochondria of *PARK2*^{-/-} mice (increased glutathione levels, increased oxidative adducts and, with age, increased SOD2 expression). That increase is however moderate (normal SOD2 expression at 12 months of age, normal proteasome activity).

Discussion

Recent work, based on the analysis of cell models overproducing Parkin and subjected to pharmacological treatments leading to immediate and global depolarization of the mitochondrial network, attributed to Parkin a central role in the clearance of dysfunctional mitochondria [12]. These studies predict that loss of function of the PINK1/Parkin pathway should lead to progressive mitochondrial impairment, possibly representing a primary

Table 1. Activities of mitochondrial respiratory chain complexes in 12-month-old *PARK2*^{-/-} and wild type mice.

| | Striatum | | Midbrain | | Cortex | |
|-------------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | <i>PARK2</i> ^{-/-} | Wild type | <i>PARK2</i> ^{-/-} | Wild type | <i>PARK2</i> ^{-/-} | Wild type |
| Complex I | 91 ± 26 | 93 ± 20 | 133 ± 31 | 138 ± 38 | 121 ± 27 | 111 ± 20 |
| Complex II | 76 ± 24 | 86 ± 21 | 248 ± 28 | 231 ± 64 | 190 ± 45 | 183 ± 38 |
| Combined II+III | 118 ± 42 | 97 ± 30 | 304 ± 81 | 326 ± 86 | 232 ± 82 | 283 ± 73 |
| Complex III | 78 ± 47 | 60 ± 19 | 372 ± 121 | 376 ± 71 | 696 ± 411 | 583 ± 154 |
| Complex IV | 398 ± 78 | 386 ± 84 | 1585 ± 598 | 1875 ± 794 | 959 ± 221 | 1112 ± 267 |
| Complex V | NA | NA | 194 ± 139 | 171 ± 59 | 170 ± 94 | 185 ± 87 |
| Citrate synthase | 455 ± 33 | 458 ± 45 | 194 ± 146 | 171 ± 162 | 170 ± 96 | 185 ± 93 |

Striatum = post-nuclear supernatants from striatum, Midbrain = crude mitochondrial pellet from ventral midbrain, Cortex = crude mitochondrial pellet from occipital cortex; complex I = rotenone sensitive NADH ubiquinone oxidoreductase, complex II = succinate ubiquinone oxidoreductase, combined II+III = succinate cytochrome c oxidoreductase, complex III = antimycin sensitive ubiquinol cytochrome c oxidoreductase, complex IV = cytochrome c oxidase, complex V = F₁F₀ ATP synthase; complex V assay requires mitochondrial preparation and was therefore not performed on striatal post-nuclear supernatants; data are expressed as nanomoles/minute and mg proteins and as means ± SD; each series of values represents 7 independent samples from each genotype.

doi:10.1371/journal.pone.0099898.t001

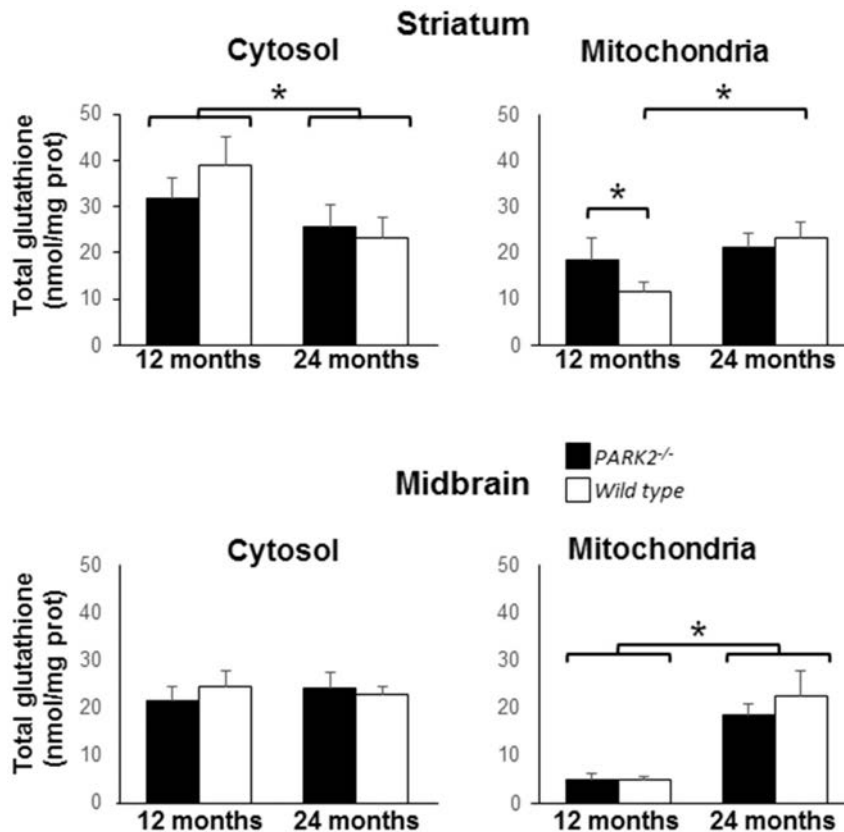


Figure 5. Increase of the mitochondrial glutathione content in striatum of 12-month-old *PARK2*^{-/-} mice. Total glutathione (GSH+GS-SG) levels were determined in cytosols and isolated mitochondria from ventral midbrain and striatum of 12- and 24-month-old *PARK2*^{-/-} (black bars) and wild-type mice (white bars), data are expressed as mean and SD of five independent measurements for each age and each genotype. * = p < 0.05 using multiple comparison with Holm-Sidak test. Significant differences with age, without influence of the genotype, were observed for midbrain mitochondrial and striatal cytosolic glutathione content. Significant interaction between age and genotype was present for striatal mitochondrial glutathione content, which significantly increased with age only in wild type mice and was at 12 months of age significantly higher in *PARK2*^{-/-} than in wild type mice.

doi:10.1371/journal.pone.0099898.g005

mechanism of neurodegeneration in autosomal recessive PD. However, whether Parkin-dependent mitochondrial quality control plays indeed a role *in vivo* under physiological conditions and during aging, remains debated.

We addressed this issue by revisiting mitochondrial functions in *PARK2*^{-/-} mice using recently developed, robust and sensitive technologies. The simultaneous analysis of minimal amounts of post-nuclear supernatants from different tissues with high resolution respirometry revealed a reliable respiratory defect specifically in the striatum of *PARK2*^{-/-} mice, which was not exacerbated by ageing. The presence of this defect was confirmed in primary

embryonic striatal neurons and was not found in cortical neurons from *PARK2*^{-/-} mice using the Seahorse technology, supporting its region-specificity and early appearance in life.

Contrary to previous observations in cell and zebrafish models [25,29,57], the constitutive deletion of *PARK2* in mice did not result in significant changes in mitochondrial membrane potential, overt oxidative stress markers or defective activity of mitochondrial complex I or other respiratory chain complexes despite the presence of significant respiratory defect. With ageing however the mitochondrial potential in the striatum showed increased sensitivity to uncoupling, with a greater impact in *PARK2*^{-/-} than in wild

Table 2. Proteasome activities were similar in *PARK2*^{-/-} and wild type mice.

| Tissue | Midbrain | | Striatum | |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 12 months | 24 months | 12 months | 24 months |
| <i>PARK2</i> ^{-/-} | 116±89 | 84±12 | 43±8 | 77±110 |
| wild type | 94±37 | 80±13 | 43±4 | 63±7 |

Chymotrypsin-like activity of the proteasome. Results are expressed as nmoles of substrate cleaved/minute and milligram of protein and as mean ± standard deviation of n = 5 measurements.

doi:10.1371/journal.pone.0099898.t002

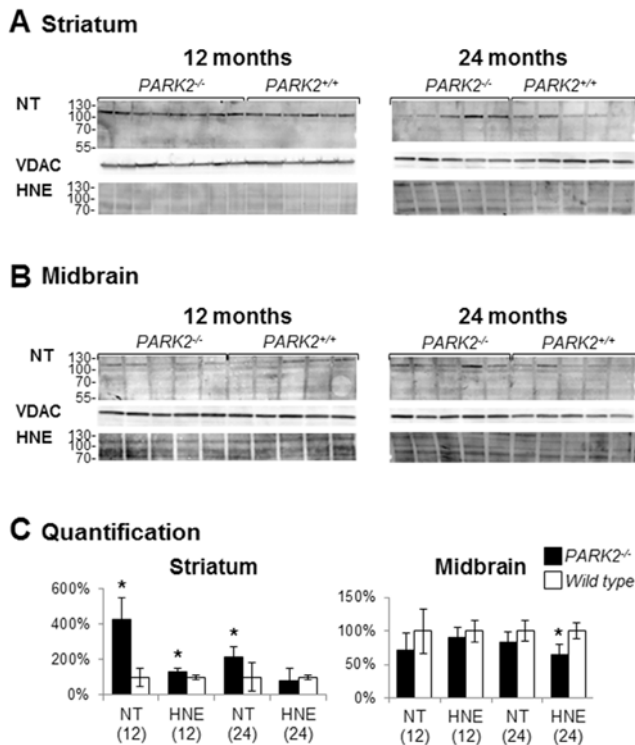


Figure 6. Presence of oxidative adducts in striatal crude mitochondrial pellets from *PARK2*^{-/-} mice. Western blot analysis of proteins from crude mitochondrial pellets from striatum (A) and midbrain (B) of *PARK2*^{-/-} and wild-type mice, at 12 and 24 months of age; loading control was the outer membrane protein Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC); (C) densitometric analysis of oxidative adducts was performed in the length of the membrane shown in A and B, that signal was then normalized to VDAC signal and quantification was expressed as means and SD and as % of the mean of wild-type samples on the membrane shown in A and B; * = *p* < 0.05 using Mann and Whitney test. doi:10.1371/journal.pone.0099898.g006

type mice, indicating less efficient compensation for an induced proton leak. As this defect cannot be ascribed to an age-dependent decline of respiratory capacity, it may be secondary to an age-dependent alteration of the inner membrane composition or defect in OXPHOS substrate transport or oxidation, all of which could add a burden to the preexisting respiration defect in *PARK2*^{-/-} mice.

The relatively mild modifications of mitochondrial function in *PARK2*^{-/-} mice suggest that Parkin does not play a predominant role in base-line mitochondrial quality control *in vivo*. Its constitutive depletion may be compensated for by parallel, redundant or alternative mitochondrial quality control mechanisms, already proposed to intervene following PINK1 depletion [60]. This possibility is supported by the recent observation in the heart of *PARK2*^{-/-} mice showing absence of a functional defect of mitochondria in the myocardium under basal conditions but defective clearing of damaged mitochondria following myocardial infarction [61] and accumulation of mitochondria with abnormal ultrastructure in myocytes during aging [62]. Therefore, as in cardiac tissue, the mitochondrial quality control function of the PINK1/Parkin pathway may become essential in the central nervous system under stress conditions, for example following accumulation of oxidative stress during ageing [63]. Consistent with this possibility, mitochondrial stress caused by the conditional

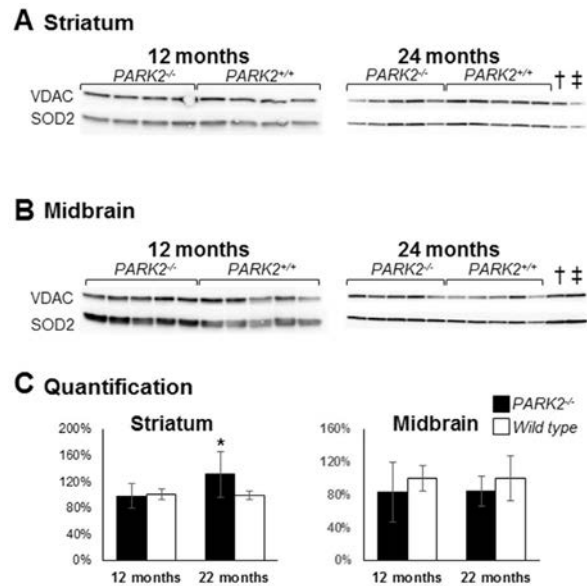


Figure 7. Increased mitochondrial Mn superoxide dismutase (SOD2) in the striatum of *PARK2*^{-/-} mice. Western blot analysis of proteins from crude mitochondrial pellets from striatum (A) and midbrain (B) of *PARK2*^{-/-} and wild-type mice, at 12 and 24 months of age; loading control was the outer membrane protein Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC); (C) densitometric analysis of the SOD2 signal shown in A and B was normalized to VDAC signal and quantification was expressed as means and SD and as % of the mean of wild-type samples on the membrane shown in A and B; * = *p* < 0.05 using Mann and Whitney test; † and ‡: samples from 12-month-old *PARK2*^{-/-} and wild type mice respectively showing that the SOD2 steady-state level does not significantly change with age. doi:10.1371/journal.pone.0099898.g007

expression of mitochondrial unfolded ornithine transcarbamylase has been recently shown to lead to dopaminergic neurodegeneration and a parkinsonian phenotype in *PINK1*^{-/-} mice [64].

Contrary to humans, the short life-time of rodents may not allow full unmasking of a phenotype following disruption of the PINK1/Parkin pathway, explaining the moderate mitochondrial defect and lack of overt neurodegeneration in *PARK2*^{-/-} mice. Signs of oxidative damage were mild in aged *PARK2*^{-/-} mice. Compensatory mechanisms such as the increase in glutathione levels, specifically in the mitochondrial fraction, may enhance the cellular antioxidant capacity and counteract oxidative stress in these mice. The relative content of reduced and oxidized glutathione should be determined in this fraction to properly evaluate the efficiency of this mechanism. Of note, we previously reported a selective increase in reduced glutathione content in total extracts from striatum and primary mesencephalic neurons of *PARK2*^{-/-} mice [39]. The increase of SOD2, often used as a marker of oxidative stress, is also a protective mechanism efficiently neutralizing superoxide anions.

In conclusion, our work revealed an early respiration defect in *PARK2*^{-/-} mice that may reflect a disease-relevant preclinical modification in autosomal recessive PD. Future studies are required to identify the molecular mechanisms underlying this modification and determine their relation to the mitochondrial quality control activity of the PINK1/Parkin pathway. To fully appreciate the role of PINK1/Parkin-dependent mitochondrial quality control in the physiopathology of autosomal recessive PD, it will also be essential to determine whether stress conditions

exacerbate mitochondrial dysfunction and unmask a neurodegenerative phenotype in the brains of *PARK2*^{-/-} mice.

Supporting Information

Figure S1 Scheme of the different brain fractionation methods used to assess mitochondrial functions. (TIF)

Figure S2 Respiratory control ratios (RCR) in 24-month-old mice. Respiratory control ratios were calculated as state 3/state 4 respiration rate on glutamate+malate as substrates; results are shown as mean and SD; numbers between brackets indicate the number of independent measurements in individual animals of each genotype (A) crude mitochondrial pellets from cortex (n = 8), crude mitochondrial pellets from striatum (n = 6) and purified mitochondrial pellets from whole brain (n = 2); (B)

References

- Schapiro AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, et al. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1: 1269.
- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapiro AHV, et al. (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115: ?
- Hauser DN, Hastings TG (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis* 51: 35–42.
- Cardoso SM (2011) The mitochondrial cascade hypothesis for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 17: 3390–3397.
- Corti O, Lesage S, Brice A (2011) What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 91: 1161–1218.
- Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, et al. (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 12: 517–526.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, et al. (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9103–9108.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, et al. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304: 1158–1160.
- Corti O, Brice A (2013) Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 23: 100–108.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183: 795–803.
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, et al. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8: e1000298.
- Narendra D, Walker JE, Youle R (2012) Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, et al. (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 378–383.
- Geisler S, Holmstrom KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, et al. (2010) The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 6: 871–878.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, et al. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189: 211–221.
- Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, et al. (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10793–10798.
- Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, et al. (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1638–1643.
- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M (2008) The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14503–14508.
- Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, et al. (2011) PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147: 893–906.
- Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W, Silverio G, et al. (2012) Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet* 8: e1002537.
- Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee YI, et al. (2011) PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 144: 689–702.
- Pacelli C, De Rasmio D, Signorile A, Grattagliano I, di Tullio G, et al. (2011) Mitochondrial defect and PGC-1alpha dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1812: 1041–1053.
- Exner N, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, et al. (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27: 12413–12418.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, et al. (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 33: 627–638.
- Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJ, Klaffke S, Abou-Sleiman P, et al. (2008) Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann Neurol* 64: 555–565.
- Moraes VA, Verstreken P, Roethig A, Smet J, Snellinx A, et al. (2009) Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med* 1: 99–111.
- Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, et al. (2011) Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16259–16264.
- Grunewald A, Gegg ME, Taanman JW, King RH, Kock N, et al. (2009) Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. *Exp Neurol* 219: 266–273.
- Grunewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, et al. (2010) Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PLoS One* 5: e12962.
- Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, et al. (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord* 19: 544–548.
- Sterky FH, Lee S, Wibom R, Olson L, Larsson NG (2011) Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12937–12942.
- Van Laar VS, Arnold B, Cassady SJ, Chu CT, Burton EA, et al. (2011) Bioenergetics of neurons inhibit the translocation response of Parkin following rapid mitochondrial depolarization. *Hum Mol Genet* 20: 927–940.
- Gautier CA, Kitada T, Shen J (2008) Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11364–11369.
- Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, et al. (2009) Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One* 4: e5777.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, et al. (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279: 18614–18622.
- Periquet M, Corti O, Jacquier S, Brice A (2005) Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* 95: 1259–1276.
- Stichel CC, Zhu XR, Bader V, Linnartz B, Schmidt S, et al. (2007) Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* 16: 2377–2393.
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, et al. (2003) Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278: 43628–43635.

post-nuclear supernatants from striatum (n = 7), midbrain (n = 8) and liver (n = 8). (TIF)

Acknowledgments

We thank Suzanne Anderson and Christelle Enond (Nouvelle Animalerie Commune, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris), Magali Michaud and Thomas Arnoux (TROPHOS) for breeding and colony management, and Jennifer Tracz (TROPHOS) for her contribution to the Seahorse experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MD CAG ALB CG RP FA FB OC AL. Performed the experiments: MD CAG ALB RFM CG MGP FA CLS AL. Analyzed the data: CAG ALB CG RP FA FB OC AL. Contributed reagents/materials/analysis tools: ALB CG RP FA FB AB OC AL. Wrote the paper: MD CAG ALB CG RP FB OC AL.

39. Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, et al. (2003) Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 12: 2277–2291.
40. Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, et al. (2004) Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10744–10749.
41. Perez FA, Palmiter RD (2005) Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2174–2179.
42. Fournier M, Vitte J, Garrigue J, Langui D, Dullin JP, et al. (2009) Parkin deficiency delays motor decline and disease manifestation in a mouse model of synucleinopathy. *PLoS One* 4: e6629.
43. Chinopoulos C, Zhang SF, Thomas B, Ten V, Starkov AA (2011) Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. *Methods Mol Biol* 793: 311–324.
44. Friedman WJ, Ibanez CF, Hallbook F, Persson H, Cain LD, et al. (1993) Differential actions of neurotrophins in the locus coeruleus and basal forebrain. *Exp Neurol* 119: 72–78.
45. Morganti MC, Taylor J, Pesheva P, Schachner M (1990) Oligodendrocyte-derived J1-160/180 extracellular matrix glycoproteins are adhesive or repulsive depending on the partner cell type and time of interaction. *Exp Neurol* 109: 98–110.
46. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, et al. (2007) Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C125–136.
47. Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, et al. (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9: 331–339.
48. Schagger H, Pfeiffer K (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I–V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 276: 37861–37867.
49. Couplan E, Gelly C, Goubern M, Fleury C, Quesson B, et al. (2002) High level of uncoupling protein 1 expression in muscle of transgenic mice selectively affects muscles at rest and decreases their IIb fiber content. *J Biol Chem* 277: 43079–43088.
50. Viengchareun S, Caron M, Auclair M, Kim MJ, Frachon P, et al. (2007) Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir Ther* 12: 919–929.
51. Auchere F, Santos R, Planamente S, Lesuisse E, Camadro JM (2008) Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 17: 2790–2802.
52. Bulteau AL, Dancis A, Gareil M, Montagne JJ, Camadro JM, et al. (2007) Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic Biol Med* 42: 1561–1570.
53. Magistretti PJ, Pellerin L (1996) Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* 777: 380–387.
54. Larsen NJ, Ambrosi G, Mullett SJ, Berman SB, Hinkle DA (2011) DJ-1 knock-down impairs astrocyte mitochondrial function. *Neuroscience* 196: 251–264.
55. Gimenez-Cassina A, Martinez-Francois JR, Fisher JK, Szlyk B, Polak K, et al. (2012) BAD-dependent regulation of fuel metabolism and K(ATP) channel activity confers resistance to epileptic seizures. *Neuron* 74: 719–730.
56. Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18: R169–176.
57. Flinn L, Mortiboys H, Volkmann K, Koster RW, Ingham PW, et al. (2009) Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain* 132: 1613–1623.
58. Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW (2007) Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 80: 93–119.
59. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL (2001) Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 34: 325–336.
60. Dagda RK, Gusdon AM, Pien I, Strack S, Green S, et al. (2011) Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 18: 1914–1923.
61. Kubli DA, Zhang X, Lee Y, Hanna RA, Quinsay MN, et al. (2013) Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction. *J Biol Chem* 288: 915–926.
62. Kubli DA, Quinsay MN, Gustafsson AB (2013) Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes. *Commun Integr Biol* 6: e24511.
63. Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20: 145–147.
64. Moiso N, Fedele V, Edwards J, Martins LM (2014) Loss of PINK1 enhances neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease triggered by mitochondrial stress. *Neuropharmacology* 77: 350–357.

Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice

Maria Damiano, Anatoly A. Starkov, Susanne Petri, Kathuna Kipiani, Mahmoud Kiaei, Marina Mattiazzi, M. Flint Beal and Giovanni Manfredi

The Department of Neurology and Neuroscience, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA

Abstract

Mitochondrial respiratory chain dysfunction, impaired intracellular Ca²⁺ homeostasis and activation of the mitochondrial apoptotic pathway are pathological hallmarks in animal and cellular models of familial amyotrophic lateral sclerosis associated with Cu/Zn-superoxide dismutase mutations. Although intracellular Ca²⁺ homeostasis is thought to be intimately associated with mitochondrial functions, the temporal and causal correlation between mitochondrial Ca²⁺ uptake dysfunction and motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis remains to be established. We investigated mitochondrial Ca²⁺ handling in isolated brain, spinal cord and liver of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase transgenic mice at different disease stages. In G93A mutant transgenic mice, we found a significant decrease in mitochondrial Ca²⁺ loading capacity in brain and spinal cord, as

compared with age-matched controls, very early on in the course of the disease, long before the onset of motor weakness and massive neuronal death. Ca²⁺ loading capacity was not significantly changed in liver G93A mitochondria. We also confirmed Ca²⁺ capacity impairment in spinal cord mitochondria from a different line of mice expressing G85R mutant Cu/Zn-superoxide dismutase. In excitable cells, such as motor neurons, mitochondria play an important role in handling rapid cytosolic Ca²⁺ transients. Thus, mitochondrial dysfunction and Ca²⁺-mediated excitotoxicity are likely to be interconnected mechanisms that contribute to neuronal degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, apoptosis, calcium homeostasis, excitotoxicity, mitochondria, permeability transition.

J. Neurochem. (2006) **96**, 1349–1361.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating, neurodegenerative disease selectively affecting upper and lower motor neurons. Pathologically, ALS is characterized by extensive loss of motor neurons in the cortex, in the spinal cord and in the brain stem, atrophy of ventral roots, corticospinal tract degeneration, neuronal inclusions of aberrant neurofilament proteins, and reactive astrocytosis (Hirano 1991).

Approximately 10% of all ALS cases are familial (fALS), about 20% of which are associated with autosomal dominant mutations in the Cu/Zn-superoxide dismutase gene, *SOD1* (Rosen *et al.* 1993). More than 100 different mutations in the *SOD1* gene have been found in fALS patients (<http://alsod1.iop.kcl.ac.uk/reports/mutations>).

Since many of the fALS-associated *SOD1* mutants have normal dismutase activity (Borchelt *et al.* 1994), *SOD1* mutations are thought to result in a toxic gain of function, and a growing body of evidence suggests that mitochondria may be involved in mutant *SOD1* toxicity (Xu *et al.* 2004).

Morphological abnormalities of mitochondria occur early in motor neurons of transgenic mice expressing mutant human *SOD1* (hSOD1), prior to the development of neuronal degeneration (Dal Canto and Gurney 1995; Wong *et al.* 1995; Kong and Xu 1998; Bendotti *et al.* 2001). At later disease stages, a mitochondrial bioenergetic dysfunction becomes apparent in the brain and spinal cord of these mice (Mattiazzi *et al.* 2002).

Received August 1, 2005; revised manuscript received October 27, 2005; accepted November 1, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Giovanni Manfredi, Weill Graduate School of Medical Sciences of Cornell University, 525 E. 68th St., A-505, New York, NY 10021, USA.

E-mail: gim2004@med.cornell.edu

Abbreviations used: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; BSA, bovine serum albumin; CSA, cyclosporin A; fALS, familial ALS; PTP, permeability transition pore; SOD, superoxide dismutase; Tg, transgenic; Wt, wild-type.

A fundamental question that remains to be answered is whether mitochondrial dysfunction correlates with the progression of SOD1 fALS. To address this question, we have studied mitochondrial Ca^{2+} capacity in brain and spinal cord of SOD1 transgenic mice at different disease stages. Alterations in Ca^{2+} homeostasis have been widely implicated in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders, including ALS (Harman 1996; Mattson 2000). In excitable cells, such as motor neurons, mitochondria play an important role in handling rapid cytosolic Ca^{2+} transients (Nicholls *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). Therefore, the impairment of this crucial mitochondrial function may contribute significantly to the pathogenesis of ALS.

To study the effects of mutant SOD1 on mitochondrial Ca^{2+} handling, we investigated Ca^{2+} capacity in mitochondria isolated from the brain and spinal cord of transgenic mice expressing mutant hSOD1 at different disease stages. We show that impaired mitochondrial Ca^{2+} handling arises very early on in the course of the disease in G93A mutant hSOD1 mice. This impairment is consistent with an increased susceptibility of hSOD1 mutant mitochondria to undergo permeability transition in response to Ca^{2+} loads. We find that in young, pre-symptomatic, G93A mice, mitochondrial Ca^{2+} capacity impairment precedes the onset of overt mitochondrial respiratory dysfunction. Furthermore, in G85R hSOD1 mutant mice, Ca^{2+} capacity impairment occurs in the absence of oxidative phosphorylation dysfunction. This suggests that Ca^{2+} capacity impairment may occur upstream in the cascade of pathogenic events leading to mitochondrial dysfunction in fALS.

Materials and methods

Transgenic mice

Transgenic mice expressing wild-type (Wt, N1029), G93A [high expressors (Gurney *et al.* 1994)] and G85R mutant hSOD1 (Bruijn *et al.* 1997), as well as non-transgenic littermates, were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred at the Weill Medical College of Cornell University animal facility. Both male and female mice expressing G93A mutant hSOD1 were studied at various disease stages and compared with non-transgenic age- and gender-matched littermates. In most experiments, a similar number of male and female pairs was used. In these mice, the symptomatic stage, characterized by muscle atrophy and weakness and gait abnormalities, is reached at approximately 3 months-of-age. The end stage, with severe weight loss and almost complete paralysis, occurs at approximately 4 months-of-age. Mice expressing G85R hSOD1 were studied at the symptomatic disease stage (i.e. at 10–12 months-of-age). Mice expressing Wt hSOD1 (N1029) do not show any sign of paralysis. N1029 mice were killed at 45 and at 140 day-of-age.

Mitochondria isolation and purification

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Weill Medical College of Cornell University. Non-synaptic brain and spinal cord mitochondria were isolated by a

Percoll (Sigma, St. Louis, MO, USA) gradient purification method as described previously (Sims 1990). All procedures were conducted at 4°C. Mice were killed by decapitation, then the forebrain was excised and homogenized in a mannitol-sucrose isolation medium (225 mM mannitol, 75 mM ultrapure sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 0.1 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) and 1 mM EGTA. Homogenates were centrifuged for 6 min at 2400 g in a Beckmann L8-80 ultracentrifuge (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA) using a 50 TI rotor. The supernatant fluid was collected and centrifuged for 14 min at 13 000 g. The resulting pellet was re-suspended in isolation medium containing 15% Percoll and 1 mM EGTA, and layered on top of a discontinuous Percoll gradient (23/40%). The gradient was centrifuged for 22 min at 38 000 g, and the 23/40 interphase layer containing the mitochondria was collected. Mitochondria were washed three times with isolation medium without BSA and centrifuged for 14 min at 13 000 g. The pellet containing purified mitochondria was resuspended in 100 μL isolation buffer without EGTA and BSA.

Spinal cord mitochondria were isolated following the same procedures as for brain, except that in order to obtain sufficient material for the assays, four spinal cords were pooled for each preparation. To collect the spinal cords, mice were killed by decapitation, then cords were extruded from the spinal column by inserting a 16-gauge needle connected to a syringe filled with homogenization buffer into the lumbar thecal sac, and squirting out the entire spinal cord through the rostral foramen.

Liver mitochondria were isolated by tissue homogenization in mannitol-sucrose buffer, as described earlier, followed by centrifugation for 10 min at 596 g in a Beckmann L8-80 ultracentrifuge using a 50 TI rotor. The supernatant fluid was filtered through a gauze and centrifuged for 11 min at 4236 g. Both centrifugation steps were repeated a second time in the same buffer, but without BSA. The mitochondria-enriched pellet was washed in mannitol-sucrose buffer without BSA and EGTA, and finally re-suspended in the same buffer.

Mitochondrial protein concentration was measured with a protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using BSA as a standard.

Measurements of mitochondrial Ca^{2+} loading capacity

Mitochondrial Ca^{2+} capacity was estimated with the fluorescent ratiometric dye Fura 6F (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Incubation medium was composed of 125 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM succinate, 1 μM rotenone and 0.2 mM ADP, with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oligomycin and 0.3 μM Fura 6. Fura 6 does not enter into mitochondria, and its fluorescence reflects the extra-mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ (Andreyev and Fiskum 1999). The ratio between the fluorescence of ion-bound and ion-free indicator decreases as mitochondria take up Ca^{2+} . The mitochondrial F_1F_0 ATPase inhibitor, oligomycin, was added to the incubation buffer to maximize the Ca^{2+} capacity of mitochondria. It was shown earlier that ADP increases the Ca^{2+} -loading threshold for permeability transition pore (PTP) opening (reviewed in Zoratti and Szabo 1995), and that a combination of oligomycin and ADP greatly increases the Ca^{2+} capacity of brain mitochondria (Panov *et al.* 2004) and mitochondria from other tissues (reviewed in Zoratti and Szabo 1995). Mitochondria (65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for brain and spinal cord and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for liver) were added to 1 mL incubation medium placed in a thermostated (37°C) fluorimeter cuvette (VWR,

Westchester, PA, USA) equipped with a magnetic stirrer. Bolus additions of CaCl₂ were made to the mitochondrial suspension in 20 nanomole increments every 200 s, and changes in Fura 6 fluorescence were recorded at 340/380 nm excitation, 510 nm emission with an F-4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). To calibrate Fura 6 fluorescence response to Ca²⁺ additions, mitochondria isolated from a non-transgenic control mouse were incubated in the same incubation medium supplemented with 1 mM KCN, 1 μM ruthenium red, and with succinate omitted. Changes in Fura 6 fluorescence ratios were recorded and plotted against the added Ca²⁺ amount. The curve obtained was fitted with a linear function, and the slope coefficient was used to convert Fura 6 fluorescence ratio into [Ca²⁺] in the medium. To calculate the amount of Ca²⁺ taken up after each bolus, we subtracted [Ca²⁺] at the end of the downward deflection, as estimated by the calibration curve, from the peak [Ca²⁺] determined by the bolus (20 μM), and normalized the resulting [Ca²⁺] difference by the mitochondrial protein. Ca²⁺ capacity results from the sum of Ca²⁺ taken up after all additions.

Electron microscopy

Brain and spinal cord mitochondria, isolated as described above, were fixed in 0.1 M Na-cacodylate buffer (containing glutaraldehyde 2.5%, paraformaldehyde 4% and picric acid 0.02%) for 60 min and then post-fixed in 1% OsO₄–1.5% K-ferricyanide (aqueous) for 60 min. Samples were then dehydrated through a graded ethanol series, infiltrated, and embedded in Spurr's resin (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA). Sections were cut at 55–60 nm using a Diatome diamond knife (Diatome, Fort Washington, PA, USA) on an RMC MT-7000 Ultramicrotome (RMC Instruments, Tucson, AZ, USA). Sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, then viewed on a JSM 100 CX-II electron microscope (JEOL, USA, Inc., Peabody, MA, USA) operated at 80 kV. Images were recorded on Kodak 4489 Electron Image film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) then digitized on an Epson Expression 1600 Pro scanner (Seiko-Epson Corporation, Suwa, Japan) at 900 dpi for publication.

Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), O₂ consumption, and ATP synthesis

Mitochondrial $\Delta\Psi_m$ was estimated using the fluorescence of safranin O (3 μM for brain and spinal cord and 6 μM for liver) with excitation and emission wavelengths of 495 nm and 586 nm, respectively (Starkov *et al.* 2002). The rate of O₂ consumption was measured in spinal cord mitochondria using a Clarke type electrode (Hansatech Inc., Cambridge, UK) as previously described (Mattiazzi *et al.* 2002), in the presence of either 5 mM succinate plus 1 μM rotenone or 7 mM pyruvate plus 1 mM malate. State 3 respiration was stimulated with 0.2 mM ADP. State 4 respiration was induced by addition of 1.6 μM carboxyatractylate. Mitochondrial ATP synthesis was measured in spinal cord mitochondria of G85R mutant hSOD1 mice using a luciferase/luciferin-based approach as previously described (Manfredi *et al.* 2002).

Measurement of cytochrome *c* release

Total mitochondrial cytochrome *c* content and the amount of cytochrome *c* released from mitochondria into the incubation buffer, with and without addition of Ca²⁺, were measured using an ELISA

kit specific for mouse cytochrome *c* (R & D System, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturers' instructions. The assay was quantified by measuring absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader (HTS 7000 Plus, Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

Reagents

All reagents were from Sigma (St Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Statistical analyses

For statistical comparison between two groups of data, such as those from the mitochondrial Ca²⁺ capacity and $\Delta\Psi_m$ in G93A and non-transgenic control mice, since *F*-tests analyses revealed a homogeneity of variances between groups, *p*-values of the differences between wild-type and mutant mice were calculated by unpaired two-tailed Student's *t*-test. A level of confidence of *p* < 0.05 was adopted. Differences among different age groups within individual mouse lines were estimated using one-way ANOVA.

Results

Impairment of Ca²⁺ loading capacity in G93A brain mitochondria

A representative example of a mitochondrial Ca²⁺ uptake measurement is shown in Fig. 1. In isolated brain mitochondria, after each bolus, there is a rapid uptake of Ca²⁺, represented by a downward deflection of the Fura 6 fluorescence trace. When the Ca²⁺ capacity is exceeded, mitochondria fail to take up Ca²⁺ further, as shown by the lack of the downward deflection. The mitochondrial Ca²⁺ capacity of brain from a G93A mouse (Fig. 1a, G93A trace) is saturated after a smaller number of additions, compared with a littermate control (Fig. 1a, non-Tg trace). When cyclosporin A (CsA, 0.5 μg/mL), a classic inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore (PTP), is added, G93A mitochondria (Fig. 1a, G93A-CsA trace) recover the Ca²⁺ capacity similar to that of non-transgenic mitochondria (Fig. 1a, non-Tg-CsA trace). This suggests that Ca²⁺ capacity impairment in G93A mitochondria is likely due to a lower threshold for Ca²⁺-induced PTP activation. In a Wt hSOD1 brain (Fig. 1b, N1029 trace), mitochondrial Ca²⁺ capacity does not differ from the non-transgenic littermate (Fig. 1b, non-Tg N1029 trace).

To confirm that the loss of Ca²⁺ capacity in G93A brain mitochondria results from Ca²⁺-induced damage rather than pre-existing structural damage, we compared mitochondrial morphology in G93A and non-transgenic brain mitochondria, before and after Ca²⁺ challenge. Non-transgenic or G93A mitochondria (120 days old) were subjected to the same number of Ca²⁺ additions, corresponding to the maximal amount of Ca²⁺ taken up by non-transgenic mitochondria. Mitochondria were imaged by electron microscopy. In the absence of Ca²⁺ challenge, both

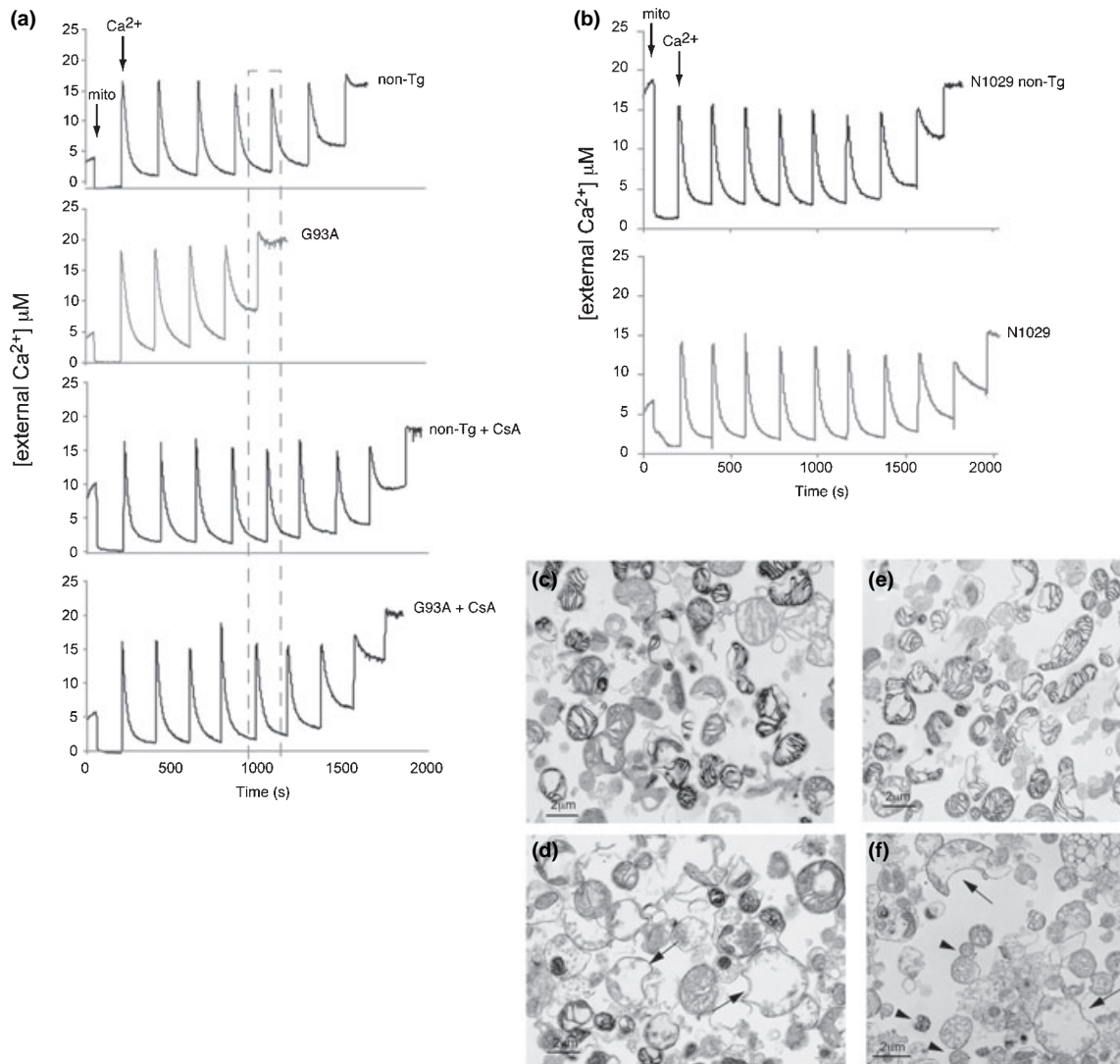


Fig. 1 Ca^{2+} uptake in mouse brain mitochondria. (a) The kinetic traces of mitochondrial Ca^{2+} uptake in brain mitochondria from 125-day-old mice were monitored by Fura 6 fluorescence ratio (340/380 nm excitation, 510 nm emission). Mito, mitochondria 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The peaks correspond to sequential bolus additions of 20 nmoles of CaCl_2 (Ca^{2+}). The downward deflections reflect mitochondrial Ca^{2+} uptake. The G93A non-transgenic (non-Tg) control mitochondria take up six additions of Ca^{2+} , whereas G93A mitochondria (G93A) show loss of Ca^{2+} uptake after four additions. The hatched rectangle highlights the addition at which Ca^{2+} is no longer taken up by G93A mitochondria. Cyclosporin A (CsA, 0.5 μM) improves Ca^{2+} capacity and abolishes the difference between mutant and control mitochondria (G93A + CsA,

non-transgenic and G93A mitochondria have a normal appearance (Figs 1c and e). After Ca^{2+} challenge, a proportion of non-transgenic mitochondria acquires the typical swollen appearance resulting from membrane permeability transition, with distended outer membranes and fragmented cristae (Kristian *et al.* 2002), whereas some mitochondria preserve a normal morphology (Fig. 1d). After Ca^{2+}

non-Tg + CsA, respectively). (b) There was no difference in the capacity to take up Ca^{2+} between a 140-day-old Wt hSOD1 (N1029) and a non-transgenic littermate (N1029 non-Tg). In these representative traces, both samples took up eight Ca^{2+} additions. Electron microscopy of Ca^{2+} -induced morphological changes in brain mitochondria (c–f). (c) Control non-Tg mitochondria without Ca^{2+} challenge. (d) Non-Tg mitochondria after Ca^{2+} challenge. Arrows indicate mitochondria that have undergone permeability transition with typical swollen appearance. (e) G93A mitochondria without Ca^{2+} challenge appear normal. (f) G93A mitochondria after Ca^{2+} challenge. The smaller arrows indicate mitochondria with condensed appearance.

challenge, all of the G93A mitochondria appear either swollen or shrunken and condensed (Fig. 1f). The latter are reminiscent of de-energized mitochondria (Candipan and Sjostrand 1984).

Ca^{2+} loading capacity in G93A brain mitochondria was investigated at various disease stages. We studied pre-symptomatic (35 and 65 days-of-age), symptomatic

(100 days-of-age) and end-stage (125 days-of-age) mice. In each experiment, age- and gender-matched non-transgenic littermates were used as controls. Ca²⁺ capacity in isolated brain mitochondria of 45 days and 140-day-old mice expressing Wt hSOD1 was also tested.

The average absolute brain mitochondria Ca²⁺ capacity in control mice increases with age, from 1131 ± 187 (standard error of the mean) nmoles/mg protein at 35 days-of-age to 2031 ± 647 nmoles/mg protein at 125 days (Fig. 2a). The age-related increase in mitochondrial Ca²⁺ capacity is statistically significant in both G93A transgenic and non-transgenic littermate groups ($p < 0.03$ and $p < 0.003$, respectively, by one-way ANOVA). Despite the age-related increase in Ca²⁺ capacity, there is a significant reduction of mitochondrial Ca²⁺ capacity in G93A mice relative to non-transgenic littermates, which starts at 65 days-of-age and persists until disease end-stage (125 days; Fig. 2b). At all ages, the addition of CsA increases Ca²⁺ capacity and abolishes the differences between transgenic and control mice (data not shown). Ca²⁺ capacity in N1029 transgenic mice, both at 45 and 140 days-of-age, is unchanged relative to littermate controls (Fig. 2b). The lack of a defect in N1029 mice as compared with their non-transgenic controls indicates that the abnormal Ca²⁺ capacity in G93A mitochondria is not simply the result of hSOD1 over-expression, but a specific effect of G93A mutant hSOD1.

Impairment of mitochondrial Ca²⁺ capacity in G93A spinal cord

Since, in hSOD1 mutant mice, motor neuron degeneration affects the spinal cord more aggressively than the brain, we investigated the Ca²⁺ capacity of mitochondria isolated from spinal cord of G93A mice and non-transgenic controls. We studied spinal cord mitochondria at two different time points prior to the onset of muscle weakness, at 35 and 68 days-of-age. There is a marked reduction in Ca²⁺ capacity in G93A relative to age- and gender-matched, non-transgenic mitochondria at both ages. Ca²⁺ capacity in 45-day-old Wt hSOD1 spinal cord mitochondria is unchanged compared with littermate non-transgenic controls (Figs 3e and f).

Ca²⁺-induced morphological alterations of G93A spinal cord mitochondria do not correlate with increased cytochrome *c* release

We compared the morphological changes and cytochrome *c* release in 68-day-old G93A and non-transgenic spinal cord mitochondria challenged with Ca²⁺. For comparison, cytochrome *c* release of untreated mitochondria was studied by incubating them in the same buffer conditions, but without addition of Ca²⁺.

In the absence of Ca²⁺ challenge, both non-transgenic and G93A mitochondria preparations contained mostly organelles with intact appearance, while a fraction of mitochondria appear to be damaged, presumably by the isolation procedure

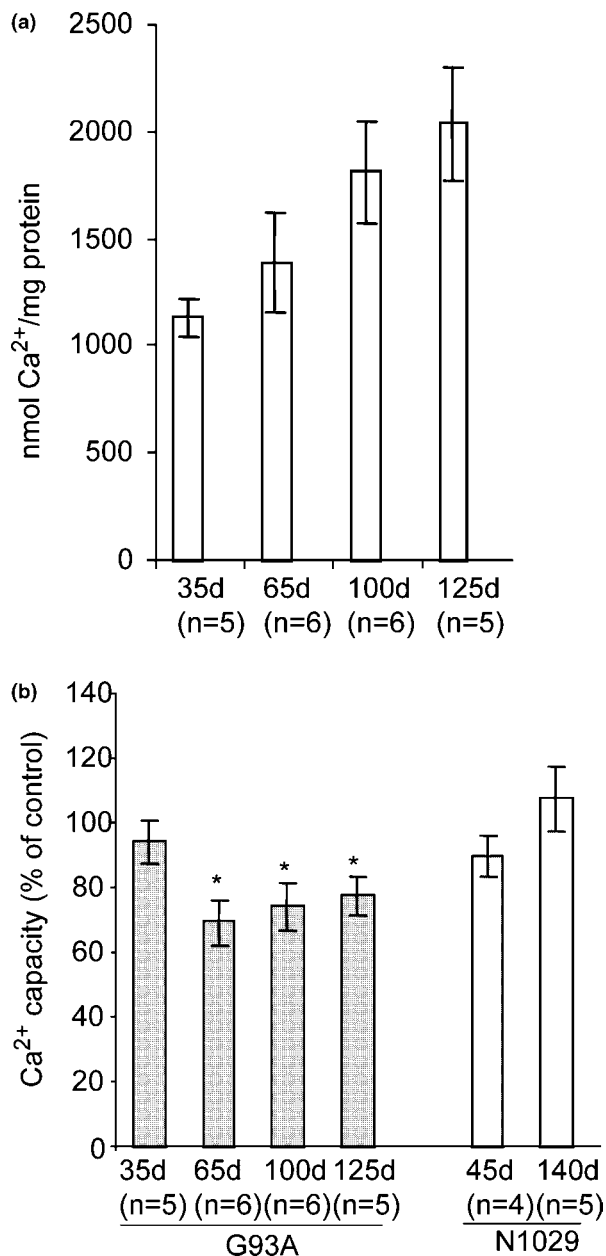


Fig. 2 Mitochondrial Ca²⁺ capacity is decreased in G93A brain mitochondria. (a) The absolute brain mitochondrial Ca²⁺ capacity increases significantly with age. Absolute values of mitochondrial Ca²⁺ capacity in non-transgenic mice are expressed in nmoles Ca²⁺/mg of protein ($p < 0.003$ by one-way ANOVA). Error bars indicate SEM; *n*-values, number of animals studied. (b) Ca²⁺ capacity of transgenic mice (G93A or Wt hSOD1, N1029) is expressed as a percentage of the capacity in non-transgenic littermates. Ca²⁺ loading capacity is significantly decreased in G93A brain mitochondria at 65 days-of-age and at later ages compared with non-transgenic littermates. At 35 days-of-age there is no significant difference between G93A and non-transgenic mice. Ca²⁺ capacity in Wt hSOD1 (N1029) transgenic mice both at 45 and 140 days is unchanged compared with age-matched non-transgenic littermates (N1029 non-Tg). Error bars indicate SEM; *n*-values, number of animals studied; *indicates $p < 0.01$.

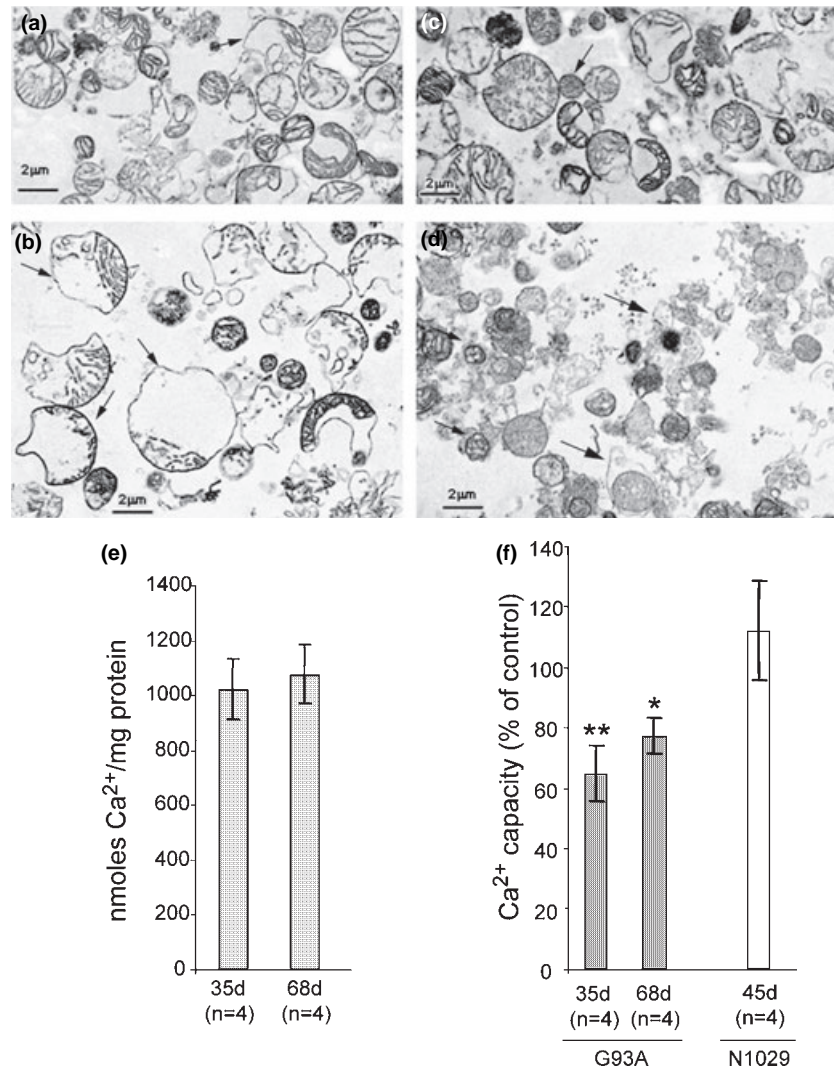


Fig. 3 Decreased mitochondrial Ca²⁺ capacity and Ca²⁺-induced morphological changes in G93A spinal cord. (a) Control non-transgenic mitochondria without Ca²⁺ challenge. The arrow indicates a damaged organelle. (b) Non-transgenic mitochondria after Ca²⁺ challenge. Arrows indicate mitochondria that have undergone permeability transition with typical swollen appearance. (c) G93A mitochondria without Ca²⁺ challenge. The arrow indicates a mitochondrion with condensed appearance. (d) G93A mitochondria after Ca²⁺ challenge. The smaller arrows indicate mitochondria with condensed appearance. Arrowheads indicate membrane remnants, possibly residues of ruptured mitochondria. (e) The absolute values of Ca²⁺ capacity expressed in nmoles/mg protein in spinal cord mitochondria

from non-transgenic mice did not change significantly between the ages of 35 and 68 days. (f) Mitochondrial Ca²⁺ capacity expressed as a percentage of the capacity in non-transgenic littermates. G93A spinal cord mitochondria show a significant reduction in Ca²⁺ capacity, both at 35 and 68 days-of-age compared with non-transgenic littermates. Mitochondrial Ca²⁺ capacity is unchanged in N1029 transgenic mice compared with non-transgenic littermates. Note that each experiment was conducted on mitochondria isolated from spinal cords of a pool of four mice, two males and two females (i.e. a total of 16 spinal cords was tested for each group). Error bars indicate SEM; *n*-values, number of pools of four spinal cords studied; ***p* < 0.01, **p* < 0.03.

(Figs 3a and c). However, the G93A preparation appears to contain a somewhat higher proportion of shrunken and condensed organelles (Fig. 3c). After Ca²⁺ challenge, the majority of non-transgenic mitochondria are swollen because of membrane permeability transition (Fig. 3b), whereas most of the G93A mitochondria appear condensed (Fig. 3d).

Approximately 10% of total mitochondrial cytochrome *c* is released in the buffer in the absence of Ca²⁺ (Table 1), most likely due to mechanical damage. Upon Ca²⁺ challenge, the release of cytochrome *c* increases to only 20% of total cytochrome *c*. These results are consistent with earlier observations that Ca²⁺-induced PTP activation does not

Table 1 Cytochrome *c* release from spinal cord mitochondria from 68-day-old mice. Cytochrome *c* was measured by ELISA in mitochondria re-suspended in Ca²⁺ assay buffer (Total) in the supernatant fluid after mitochondria sedimentation prior to Ca²⁺ challenge (Supernatant), and in the supernatant fluid after Ca²⁺ challenge and mitochondrial sedimentation (Supernatant + Ca²⁺). Each experiment was conducted on mitochondria isolated from a pool of four spinal cords from 68-day-old mice. In both G93A and non-Tg samples, Ca²⁺ boluses matched the number of additions corresponding to the maximal amount of Ca²⁺ taken up by non-transgenic mitochondria. There are no statistically significant differences between G93A and non-Tg mitochondria. Values are nmoles cytochrome *c*/mg protein \pm SEM; number of pools of four spinal cords studied = 3

| | Total | Supernatant | Supernatant + Ca ²⁺ |
|--------|----------------|---------------|--------------------------------|
| Non-Tg | 5710 \pm 509 | 557 \pm 36 | 1033 \pm 120 |
| G93A | 4928 \pm 449 | 517 \pm 100 | 892 \pm 96 |

result in a massive cytochrome *c* release from neural mitochondria (Andreyev and Fiskum 1999). Under all conditions, there is no statistically significant difference in the amount of cytochrome *c* released from G93A and non-transgenic mitochondria (Table 1).

Ca²⁺-induced loss of $\Delta\Psi_m$ in mitochondria of G93A mice

We examined changes of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in response to Ca²⁺ load in G93A brain mitochondria at 35, 65 and 125 days-of-age. As shown by a representative trace in Fig. 4(a), after each Ca²⁺ addition, a drop in $\Delta\Psi_m$ (de-polarization) is followed by a partial re-polarization. There is no statistically significant difference between G93A and non-transgenic mitochondria in $\Delta\Psi_m$ prior to Ca²⁺ addition ($\Delta\Psi_{m-ini}$; data not shown). However, we observed that after each Ca²⁺ addition, mitochondrial re-polarization is less efficient in G93A than in non-transgenic mitochondria. In order to quantify this difference, experiments were conducted in parallel in one non-transgenic and one transgenic sample. $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge is measured as the ability of mitochondria to re-polarize after challenge with either low or high Ca²⁺ loads. Low loads were 40 nmoles Ca²⁺ in all experiments; high Ca²⁺ loads were set for both non-Tg and transgenic mitochondria at the penultimate Ca²⁺ addition preceding the complete de-polarization of transgenic mitochondria (i.e. 120 nmoles Ca²⁺ in the example in Fig. 4a). In brain, G93A mitochondria exhibit a statistically significant reduction in $\Delta\Psi_m$ in response to high Ca²⁺ loads starting at 65 days-of-age (Fig. 4b upper panel).

In spinal cord mitochondria, we did not find a significant difference in the decrease of $\Delta\Psi_m$ in response to high Ca²⁺ loads between G93A and control mitochondria (Fig. 4c lower panel). However, in brain and spinal cords of younger G93A mice (65 and 35 days-of-age, respectively), mitochondria were significantly more sensitive to low Ca²⁺ loads (i.e. 40 nmoles; Figs 4b and c, upper panels).

Mitochondrial oxygen consumption is unchanged in spinal cord from pre-symptomatic G93A mice

We measured complex I and complex II driven oxygen consumption in the presence of malate plus pyruvate and succinate plus rotenone, respectively. State 3 respiration was inhibited by the addition of carboxyatractylate, a specific inhibitor of the adenine nucleotide translocator. Although previously it had been shown that, under certain experimental conditions, G93A spinal cord has impaired mitochondrial respiratory chain function (Mattiazzi *et al.* 2002; Kirkinetzos *et al.* 2005), under our experimental conditions, spinal cord mitochondria from pre-symptomatic G93A mice do not display significant differences in respiration as compared with non-transgenic controls (Fig. 4d). These data suggest that the reduction of Ca²⁺ capacity does not result from impaired respiration *per se*, at least in the early stages of the disease.

Ca²⁺ capacity and $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge is unchanged in G93A liver mitochondria

To determine whether mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment is a tissue-specific trait or a more generalized phenomenon that also affects non-neural tissues, we studied mitochondria isolated from liver of G93A mice. Ca²⁺ capacity in transgenic mice is not decreased compared with non-transgenic littermates, both at 67 and 120 days-of-age (Fig. 5a). Mitochondrial $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge, calculated as described earlier for brain and spinal cord mitochondria, is unchanged in liver from 120-day-old G93A transgenic mice, as compared with non-transgenic littermates (Fig. 5b).

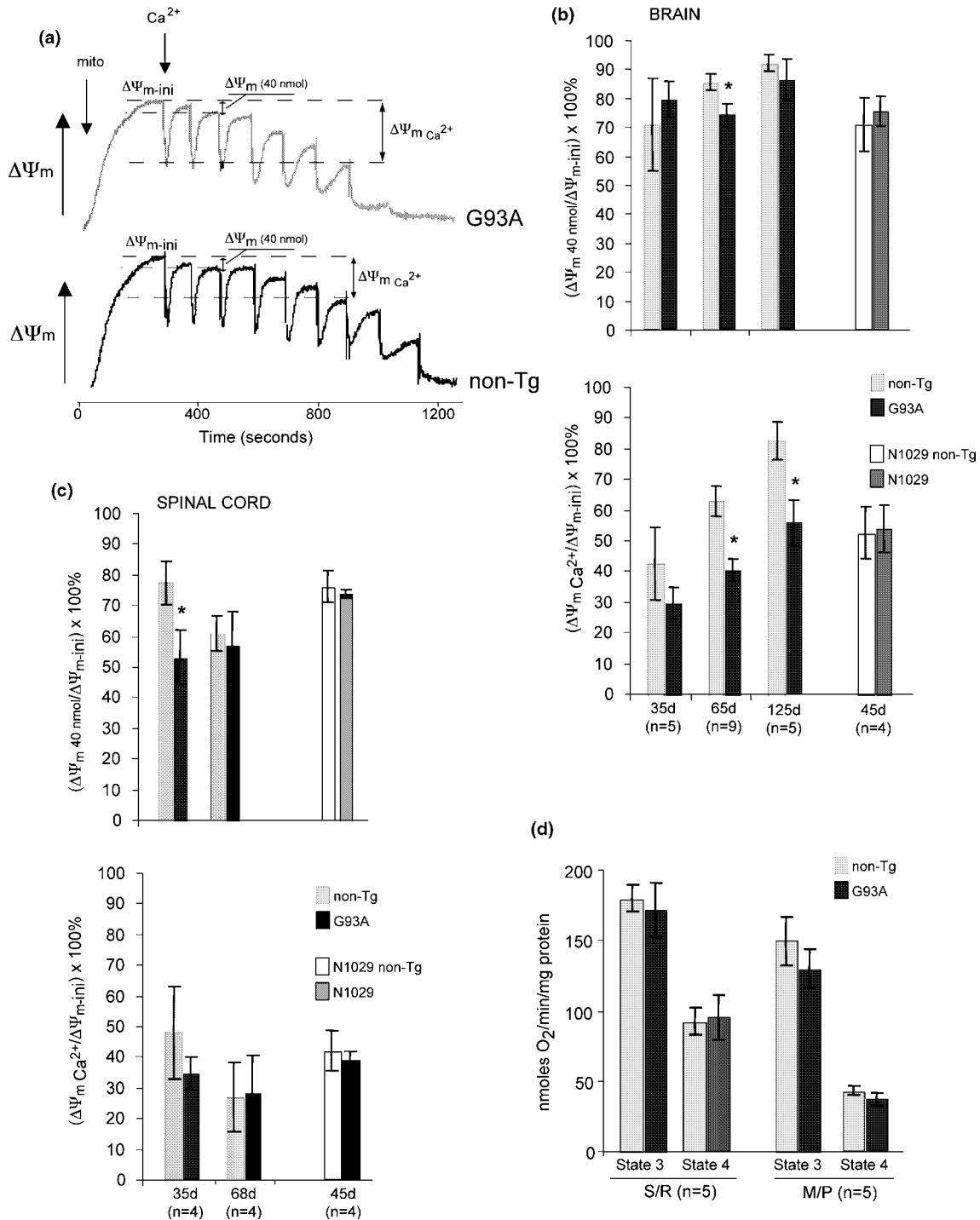
Mitochondrial Ca²⁺ capacity and sensitivity of $\Delta\Psi_m$ to Ca²⁺ challenge in G85R spinal cord

To assess whether a reduction in mitochondrial Ca²⁺ loading capacity is common to other murine models of fALS, we studied spinal cord mitochondria from symptomatic G85R mice at 10–12 months-of-age. We found that Ca²⁺ loading capacity is variable both in transgenic and non-transgenic groups, possibly because of an aging effect. However, there is a statistically significant reduction in G85R spinal cord mitochondria. The Ca²⁺ loading capacity in G85R spinal cords is 73 \pm 7% of non-transgenic controls ($p < 0.03$). We did not find significant differences in $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge, calculated either after low or high Ca²⁺ loads between G85R mice and controls (Table 2). Unlike symptomatic G93A mice (Mattiazzi *et al.* 2002), in fully symptomatic G85R spinal cord mitochondria, there is no reduction in ATP synthesis and oxygen consumption (Table 2). These data confirm that a decrease in mitochondrial Ca²⁺ loading capacity is a common trait of mutant hSOD1 mice, and that it does not appear to correlate with a reduction in respiratory chain function.

Discussion

Although much is known about the genetic defects underlying SOD1-related fALS, the molecular and biochemical mechanisms that cause the ‘toxic’ effect of mutant SOD1 are still far from being understood. One of the major puzzles that remains to be solved is that of the tissue specificity of the degenerative process. Both in fALS patients and in

transgenic animals, mutant SOD1 is ubiquitously expressed and its effect is not limited to motor neurons, since transgenic mice expressing mutant SOD1 exclusively in neurons or in glia do not develop disease (Gong *et al.* 2000; Lino *et al.* 2002), and both neurons and glia must express the mutant protein for the disease to take place (Clement *et al.* 2003). Yet, only certain types of neuronal cells degenerate.



Several lines of evidence indicate that mitochondria may be implicated in the selectivity of SOD1 toxicity. First, although the majority of SOD1 is localized in the cytosol, a portion of the protein is localized in mitochondria (Jaarsma *et al.* 2001; Okado-Matsumoto and Fridovich 2001; Sturtz *et al.* 2001; Higgins *et al.* 2002; Field *et al.* 2003). Mutant SOD1 is more abundant in mitochondria from nervous tissue than in other non-affected ones, such as liver or heart (Mattiuzzi *et al.* 2002; Liu *et al.* 2004; Vijayvergiya *et al.* 2005). Furthermore, mutant hSOD1 has been shown to accumulate in the mitochondria of spinal cord from mutant hSOD1 transgenic mice (Liu *et al.* 2004) where it interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Pasinelli *et al.* 2004). Second, mutant SOD1 forms aberrant aggregates in the mitochondria of the neural tissue and not in other, non-affected tissues of SOD1 transgenic mice (Mattiuzzi *et al.* 2002; Liu *et al.* 2004; Vijayvergiya *et al.* 2005). Third, since Ca²⁺-mediated glutamate excitotoxicity is one of the potential mechanisms for the tissue specificity of SOD1 toxicity (Rothstein 1996), the impairment of Ca²⁺ handling in SOD1 mutant mitochondria may provide a link between mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. Because mitochondria are a major short-term buffering system of intracellular Ca²⁺ (Nicholls *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003), an impairment of mitochondrial Ca²⁺ handling may precipitate excitotoxic events in excitable cells that undergo high Ca²⁺ influx in response to glutamate (White and Reynolds 1996). Elevation of cytosolic Ca²⁺ levels in neurons may compromise mitochondrial integrity and functions in a number of ways, for example, by inducing enhanced production of free radicals from mitochondria (Reynolds and Hastings 1995). There is compelling evidence that free radicals play a major role in neuronal death (Beal 2004), although neither the source of these radicals nor the precise

nature of the connection between Ca²⁺ mobilization and free radical production has been conclusively defined. It has been suggested that aberrant copper chemistry by mutant SOD1 causes oxidative damage and apoptosis in neuronal cells (Estevez *et al.* 1999), and that antioxidant agents extend survival in mutant hSOD1 transgenic mice (Jung *et al.* 2001; Wu *et al.* 2003).

Disturbed intracellular Ca²⁺ homeostasis has been previously reported in cultured primary motor neurons from G93A transgenic mice (Kruman *et al.* 1999; Kim *et al.* 2002). However, these studies did not address the role of mitochondria in Ca²⁺ handling. Here, we demonstrate impaired Ca²⁺ capacity in isolated mitochondria from brain and spinal cord of mutant hSOD1 mice (Figs 1–3). Liver, a non-affected tissue, does not display mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment in G93A mice, even at late disease stages (Fig. 5). In spinal cord mitochondria of G93A mice, Ca²⁺ capacity is impaired at as early as 35 days-of-age (Fig. 3). At this stage, these mice do not manifest symptoms of paralysis or pathological signs of motor neuron degeneration. These results strongly suggest that an early impairment in a critical mitochondrial function, such as Ca²⁺ handling, may precede the onset of neurodegeneration *in vivo*.

In pre-symptomatic G93A mice, brain and spinal cord mitochondria do not show defects of oxidative phosphorylation (Mattiuzzi *et al.* 2002). However, in these mitochondria, we observed a more pronounced depolarization induced by low Ca²⁺ loads compared with non-transgenic controls. This difference was not detected in mitochondria from older, symptomatic G93A or G85R mice (Figs 4b and c, Table 2). This observation suggests that mitochondria from younger mutant hSOD1 mice may be more prone to damage induced by intense workload. For high Ca²⁺ loads, we observed increased mitochondrial depolarization in G93A brain, but

Fig. 4 $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge in brain and spinal cord mitochondria. (a) In this representative experiment in a 120-day-old G93A mouse and a non-Tg littermate, sequential Ca²⁺ bolus additions (20 nmoles) cause mitochondrial depolarization, as shown by a sharp downward deflection, followed by a gradual recovery of the trace. $\Delta\Psi_{m-ini}$, $\Delta\Psi_m$ prior to Ca²⁺ addition. $\Delta\Psi_m$ 40 nmol, $\Delta\Psi_m$ resulting from re-polarization after two Ca²⁺ additions. $\Delta\Psi_{m-Ca^{2+}}$, $\Delta\Psi_m$ resulting from re-polarization after the addition of 120 nmoles CaCl₂ (in this experiment). Mito, mitochondria 65 μ g/mL. The sensitivity of $\Delta\Psi_m$ to Ca²⁺ challenge is represented by the difference between $\Delta\Psi_{m-ini}$ and either $\Delta\Psi_m$ 40 nmol or $\Delta\Psi_{m-Ca^{2+}}$, as indicated by the dashed lines. Ca²⁺-induced brain (b) and spinal cord (c) $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge is calculated in two different ways. The first corresponds to $\Delta\Psi_m$ sensitivity to low Ca²⁺ loads (40 nmol) and is calculated as $(\Delta\Psi_m \text{ 40 nmol}/\Delta\Psi_{m-ini}) \times 100\%$ (upper panels in b and c). There is a significant defect of re-polarization (indicated by asterisks, **p* < 0.03) in brain at 65 days-of-age and in spinal cord at 35 days-of-age. The second corresponds to $\Delta\Psi_m$ sensitivity to high Ca²⁺ loads ($\Delta\Psi_{m-Ca^{2+}}$), and is set, for both non-Tg and transgenic

(G93A or N1029) mitochondria, at $\Delta\Psi_{m-Ca^{2+}}$ resulting from the re-polarization that follows the penultimate Ca²⁺ addition, before the complete de-polarization of transgenic mitochondria (i.e. 120 nmoles CaCl₂ in the example in a). There is a significant defect of re-polarization only in G93A brain mitochondria (b, lower panel), starting at 65 days-of-age, but not in spinal cord (c, lower panel). Mitochondrial $\Delta\Psi$ sensitivity to Ca²⁺ challenge is unchanged in brain and spinal cord from 45-day-old N1029 transgenic mice as compared with non-transgenic littermates (b and c). Error bars indicate SEM; *n*-values, number of animals (brain) or of pools of spinal cords studied. (d) The rate of oxygen consumption of spinal cord mitochondria was measured with either succinate (5 mM) plus rotenone (1 μ M) (S/R) or pyruvate (7 mM) plus malate (1 mM) (M/P). There are no statistically significant differences between non-Tg and G93A mitochondria either in the ADP-induced state 3 (phosphorylating) or in the carboxyatractylate-induced state 4 (resting) respiration. Bars represent the average of two experiments performed on 35-day-old mice plus three experiments on 68-day-old mice. Error bars indicate SEM.

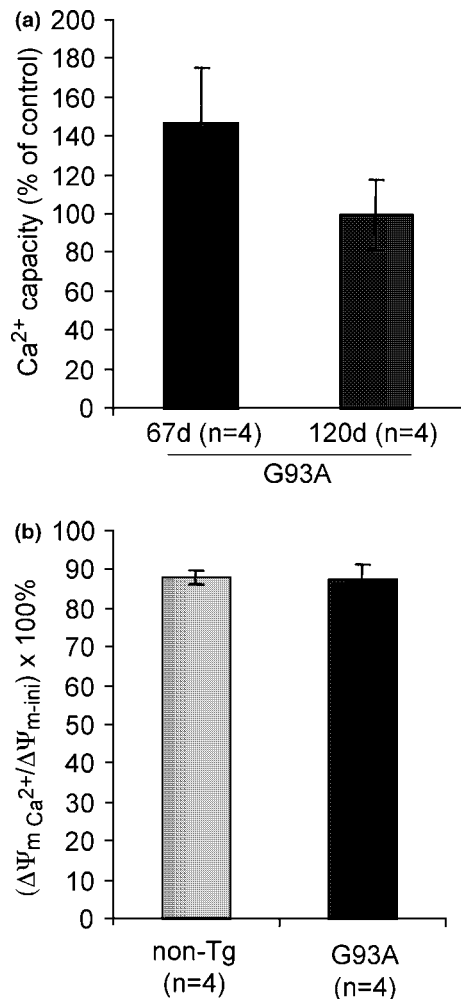


Fig. 5 Ca²⁺ capacity and $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge in liver mitochondria is unchanged in G93A mice. (a) Ca²⁺ capacity of G93A liver mitochondria, expressed as a percentage of the capacity in non-Tg littermates, is unchanged, both at 67 and 120 days-of-age. (b) Mitochondrial $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge, calculated as described in the legend to Fig. 4, is unchanged in liver from 120-day-old G93A transgenic mice, as compared with non-transgenic littermates. Error bars indicate SEM; *n*-values, number of animals studied.

not in spinal cord (Figs 4b and c). There may be different explanations for this observation. First, it may reflect inherent differences in bioenergetics between brain and spinal cord mitochondria (Sullivan *et al.* 2004). This is confirmed by the observation that in both G93A and control spinal cord, the Ca²⁺-induced $\Delta\Psi_m$ decrease was more pronounced than in brain (Figs 4b and c). It is also consistent with the observation that in both non-transgenic and G93A mice, Ca²⁺ capacity increases with age (Fig. 2a) in brain, but not in spinal cord (Fig. 3e). Second, it may also reflect the progressively different cellular composition in the degenerating tissue. It is possible that mitochondrial bioenergetics in SOD1 mutant astrocytes may be less affected than in

neurons. Because, in mutant hSOD1 mice, astrocytosis is much more pronounced in spinal cord than in brain (Gurney *et al.* 1994), and because, in our experiments, mitochondria are isolated from the total cellular pool, in the later stages of the disease a shift of the cell population towards increased astrocytes may mask the bioenergetic defect in the spinal cord. Third, the $\Delta\Psi_m$ decrease with high Ca²⁺ loads in the brain of G93A mice may reflect a compensatory mechanism. Such a mechanism may limit the amount of Ca²⁺ taken up by mitochondria, thereby preserving their integrity.

In vivo, reduced mitochondrial Ca²⁺ capacity may result in enhanced susceptibility to Ca²⁺-mediated mitochondrial PTP opening, especially under conditions of metabolic stress (Scanlon and Reynolds 1998). PTP opening is facilitated by high Ca²⁺ load, $\Delta\Psi_m$ decrease and production of free radicals (Zoratti and Szabo 1995), and is prevented by CsA. We found that, in SOD1 mutant mitochondria, CsA attenuates the Ca²⁺ capacity impairment (Fig. 1a). This observation agrees with the hypothesis that PTP plays a role in the pathogenesis of fALS (Karlsson *et al.* 2004; Kirkinetzos *et al.* 2004).

Interestingly, we also found that upon Ca²⁺ challenge, many mutant spinal cord mitochondria undergo morphological changes that are suggestive of energy loss (Candipan and Sjostrand 1984) rather than PTP-induced swelling (Fig. 3). A similar, although less pronounced, phenomenon is observed also in G93A brain mitochondria (Fig. 1). It is possible that the Ca²⁺ challenge de-energizes a portion of spinal cord G93A mitochondria before they can accumulate enough Ca²⁺ to reach the PTP opening threshold. It is also possible that Ca²⁺ may activate a 'low conductance' permeability pore, which does not result in mitochondrial swelling but is CsA sensitive (Novgorodov and Gudz 1996). This scenario appears to correlate well with the Ca²⁺-induced defect of re-polarization at 'low Ca²⁺ loads', in G93A spinal cord and brain mitochondria.

Although the mechanisms leading to cell death in ALS are still unclear, several lines of evidence suggest that the mitochondrial apoptotic pathway may play a role. In spinal motor neurons of G93A transgenic mice, cytochrome *c* is released from mitochondria, leading to caspase 9 activation (Guegan *et al.* 2001). Both inhibition of caspase activation (Li *et al.* 2000) and the overexpression of the mitochondrial anti-apoptotic protein Bcl-2 (Kostic *et al.* 1997) slow motor neuron degeneration and extend the survival of SOD1 mutant mice. However, other observations argue against a significant contribution of apoptosis to the pathogenesis of SOD1 fALS. SOD1 mice genetically lacking caspase 11 (Kang *et al.* 2003), an upstream regulator of the executioner caspases 1 and 3, showed no improvement of disease phenotype. Furthermore, morphological and biochemical markers of apoptotic cell death are difficult to detect, both in ALS patients and in transgenic mice (Migheli *et al.* 1999).

Table 2 Oxidative phosphorylation and Ca²⁺ capacity in spinal cord mitochondria of 10–12-month-old G85R mice. Oxygen consumption and ATP synthesis were measured on isolated mitochondria using malate and glutamate as substrates, as previously described (Manfredi *et al.* 2002). Values are averages \pm SD. Ca²⁺ capacity and $\Delta\Psi_m$ were measured, as described in Methods. Values are averages \pm SEM. G85R mice have a statistically significant decrease in Ca²⁺ capacity in spinal cord mitochondria, whereas differences in respiration, ATP synthesis and $\Delta\Psi_m$ sensitivity to Ca²⁺ challenge were not significant

| | Respiration (nmol O ₂ /min/mg) | ATP synthesis (nmol ATP/min/mg) | Ca ²⁺ capacity (% of non-Tg) | $\Delta\Psi_m$ 40 nmol (% of $\Delta\Psi_{m-ini}$) | $\Delta\Psi_m$ Ca ²⁺ (% of $\Delta\Psi_{m-ini}$) |
|--------|--|------------------------------------|--|--|---|
| Non-Tg | 557 \pm 70 (n = 6) | 189 \pm 51 (n = 6) | 100 (n = 4) | 79.5 \pm 12.1 (n = 4) | 59.8 \pm 19.9 (n = 4) |
| G85R | 456 \pm 80 (n = 5) | 181 \pm 54 (n = 5) | 73 \pm 7 (n = 4) (<i>p</i> < 0.03) | 74.3 \pm 11.6 (n = 4) | 45.7 \pm 14.7 (n = 4) |

In vitro, mitochondrial PTP opening results in swelling and damage of organelles (Zoratti and Szabo 1995) that may result in cytochrome *c* release. However, we found no difference in the amount of cytochrome *c* released from G93A spinal cord mitochondria, as compared with controls, upon Ca²⁺ challenge (Table 1). The absence of correlation between PTP opening and cytochrome *c* release in mitochondria from neural tissue was reported earlier (Andreyev and Fiskum 1999).

It was shown that in symptomatic G93A spinal cord mitochondria, most respiratory chain complexes are partially suppressed (Jung *et al.* 2002; Mattiazzi *et al.* 2002). Here, we show that in G93A mice, decreased mitochondrial Ca²⁺ capacity precedes the respiratory chain defects (Fig. 4d) and, in G85R mice, it occurs in the absence of overt respiratory chain defects (Table 2). These results suggest that impaired mitochondrial Ca²⁺ capacity in mutant hSOD1 mice occurs early on in the progression of the disease, affects neural tissue preferentially and is not necessarily associated with respiratory chain defects.

Nevertheless, the abnormal mitochondrial Ca²⁺ handling in G93A mice may eventually result in respiratory chain impairment (Jung *et al.* 2002; Mattiazzi *et al.* 2002; Kirkinetzos *et al.* 2005). For example, inhibition of mitochondrial enzymes, involved in respiration and oxidative phosphorylation, by Ca²⁺ is well documented (Villalobo and Lehninger 1980; Roman *et al.* 1981; Lai and Cooper 1986; Lai *et al.* 1988). Accumulated Ca²⁺ may also decrease the intramitochondrial pool of ADP, thus reducing the exchangeable pool and the amount of ADP available to the F₁F₀ ATPase (Lai and Cooper 1986). Progressive accumulation of large amounts of Ca²⁺ and P_i results in Ca²⁺–P_i precipitate formation in the mitochondrial matrix (Chalmers and Nicholls 2003; Chinopoulos *et al.* 2003). Mitochondria from neural tissues can accumulate such significant amounts of Ca²⁺ [2000–4000 nmol/mg protein (Chalmers and Nicholls 2003; Chinopoulos *et al.* 2003) and Figs 2 and 3] that the precipitate may literally fill up the mitochondrial matrix water space, thus creating diffusion limitations for substrate delivery to primary dehydrogenases.

Excitable cells, such as motor neurons, are exposed to repetitive Ca²⁺ challenges *in vivo*. It is possible that over time, these Ca²⁺ challenges in mutant hSOD1 neurons with abnormal mitochondrial Ca²⁺ handling may contribute to accelerating cell damage and, eventually, cell death.

Acknowledgements

We thank Leona Cohen-Gould (Weill Medical College of Cornell University microscopy facility) for preparation and imaging of electron micrographs. This work was supported by Telethon Italia ONLUS (MD) Foundation, the Robert Packard ALS Research Center 'The New York Community Trust' (GM), and NIH/NINDS grant P01 NS011766-27 (GM).

References

- Andreyev A. and Fiskum G. (1999) Calcium induced release of mitochondrial cytochrome *c* by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell Death Differ.* **6**, 825–832.
- Beal M. F. (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 381–386.
- Bendotti C., Calvaresi N., Chiveri L., Prella A., Moggio M., Braga M., Silani V. and De Biasi S. (2001) Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J. Neurol. Sci.* **191**, 25–33.
- Borchelt D. R., Lee M. K., Slunt H. S., Guarnieri M., Xu Z. S., Wong P. C., Brown R. H., Jr, Price D. L., Sisodia S. S. and Cleveland D. W. (1994) Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 8292–8296.
- Brujin L. I., Becher M. W., Lee M. K. *et al.* (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**, 327–338.
- Candipan R. C. and Sjostrand F. S. (1984) An analysis of the contribution of the preparatory technique to the appearance of condensed and orthodox conformations of liver mitochondria. *J. Ultrastruct. Res.* **89**, 281–294.
- Chalmers S. and Nicholls D. G. (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 19 062–19 070.

- Chinopoulos C., Starkov A. A. and Fiskum G. (2003) Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J. Biol. Chem.* **278**, 27 382–27 389.
- Clement A. M., Nguyen M. D., Roberts E. A. *et al.* (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* **302**, 113–117.
- Dal Canto M. C. and Gurney M. E. (1995) Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* **676**, 25–40.
- Estevez A. G., Crow J. P., Sampson J. B., Reiter C., Zhuang Y., Richardson G. J., Tarpey M. M., Barbeito L. and Beckman J. S. (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* **286**, 2498–2500.
- Field L. S., Furukawa Y., O'Halloran T. V. and Culotta V. C. (2003) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 28 052–28 059.
- Gong Y. H., Parsadanian A. S., Andreeva A., Snider W. D. and Elliott J. L. (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J. Neurosci.* **20**, 660–665.
- Guegan C., Vila M., Rosoklija G., Hays A. P. and Przedborski S. (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **21**, 6569–6576.
- Gurney M. E., Pu H., Chiu A. Y. *et al.* (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772–1775.
- Harman D. (1996) Aging and disease: extending functional life span. *Ann. N Y Acad. Sci.* **786**, 321–336.
- Higgins C. M., Jung C., Ding H. and Xu Z. (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J. Neurosci.* **22**, RC215.
- Hirano A. (1991) *Cytopathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis*, Vol. 56, pp. 91–101. Raven Press, New York.
- Jaarsma D., Rognoni F., van Duijn W., Verspaget H. W., Haasdijk E. D. and Holstege J. C. (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **102**, 293–305.
- Jung C., Rong Y., Doctrow S., Baudry M., Malfroy B. and Xu Z. (2001) Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Neurosci. Lett.* **304**, 157–160.
- Jung C., Higgins C. M. and Xu Z. (2002) A quantitative histochemical assay for activities of mitochondrial electron transport chain complexes in mouse spinal cord sections. *J. Neurosci. Meth.* **114**, 165–172.
- Kang S. J., Sanchez I., Jing N. and Yuan J. (2003) Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **23**, 5455–5460.
- Karlsson J., Fong K. S., Hansson M. J., Elmer E., Csiszar K. and Keep M. F. (2004) Life span extension and reduced neuronal death after weekly intraventricular cyclosporin injections in the G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosurg.* **101**, 128–137.
- Kim H. J., Kim M., Kim S. H., Sung J. J. and Lee K. W. (2002) Alteration in intracellular calcium homeostasis reduces motor neuronal viability expressing mutated Cu/Zn superoxide dismutase through a nitric oxide/guanylyl cyclase cGMP cascade. *Neuroreport* **13**, 1131–1135.
- Kirkinezos I. G., Hernandez D., Bradley W. G. and Moraes C. T. (2004) An ALS mouse model with a permeable blood–brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment. *J. Neurochem.* **88**, 821–826.
- Kirkinezos I. G., Bacman S. R., Hernandez D., Oca-Cossio J., Arias L. J., Perez-Pinzon M. A., Bradley W. G. and Moraes C. T. (2005) Cytochrome *c* association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J. Neurosci.* **25**, 164–172.
- Kong J. and Xu Z. (1998) Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J. Neurosci.* **18**, 3241–3250.
- Kostic V., Jackson-Lewis V., de Bilbao F., Dubois-Dauphin M. and Przedborski S. (1997) Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **277**, 559–562.
- Kristian T., Weatherby T. M., Bates T. E. and Fiskum G. (2002) Heterogeneity of the calcium-induced permeability transition in isolated non-synaptic brain mitochondria. *J. Neurochem.* **83**, 1297–1308.
- Kruman I. I., Pedersen W. A., Springer J. E. and Mattson M. P. (1999) ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* **160**, 28–39.
- Lai J. C. and Cooper A. J. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* **47**, 1376–1386.
- Lai J. C., DiLorenzo J. C. and Sheu K. F. (1988) Pyruvate dehydrogenase complex is inhibited in calcium-loaded cerebrocortical mitochondria. *Neurochem. Res.* **13**, 1043–1048.
- Li M., Ona V. O., Guegan C. *et al.* (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* **288**, 335–339.
- Lino M. M., Schneider C. and Caroni P. (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.* **22**, 4825–4832.
- Liu J., Lillo C., Jonsson P. A. *et al.* (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* **43**, 5–17.
- Manfredi G., Yang L., Gajewski C. D. and Mattiazzi M. (2002) Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* **26**, 317–326.
- Mattiazzi M., D'Aurelio M., Gajewski C. D., Martushova K., Kiaei M., Beal M. F. and Manfredi G. (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 29 626–29 633.
- Mattson M. P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 120–129.
- Migheli A., Atzori C., Piva R., Tortarolo M., Girelli M., Schiffer D. and Bendotti C. (1999) Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat. Med.* **5**, 966–967.
- Nicholls D. G., Vesce S., Kirk L. and Chalmers S. (2003) Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium* **34**, 407–424.
- Novgorodov S. A. and Guduz T. I. (1996) Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 139–146.
- Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 38 388–38 393.
- Panov A. V., Andreeva L. and Greenamyre J. T. (2004) Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 44–52.

- Pasinelli P., Belford M. E., Lennon N., Bacskai B. J., Hyman B. T., Trotti D. and Brown R. H., Jr (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* **43**, 19–30.
- Reynolds I. J. and Hastings T. G. (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* **15**, 3318–3327.
- Roman I., Clark A. and Swanson P. D. (1981) The interaction of calcium transport and ADP phosphorylation in brain mitochondria. *Membr. Biochem.* **4**, 1–9.
- Rosen D. R., Siddique T., Patterson D. *et al.* (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62.
- Rothstein J. D. (1996) Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* **47**, S19–S25; discussion S26.
- Scanlon J. M. and Reynolds I. J. (1998) Effects of oxidants and glutamate receptor activation on mitochondrial membrane potential in rat forebrain neurons. *J. Neurochem.* **71**, 2392–2400.
- Sims N. R. (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* **55**, 698–707.
- Starkov A. A., Polster B. M. and Fiskum G. (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J. Neurochem.* **83**, 220–228.
- Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R. and Culotta V. C. (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallo-chaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **276**, 38 084–38 089.
- Sullivan P. G., Rabchevsky A. G., Keller J. N., Lovell M., Sodhi A., Hart R. P. and Scheff S. W. (2004) Intrinsic differences in brain and spinal cord mitochondria: Implication for therapeutic interventions. *J. Comp. Neurol.* **474**, 524–534.
- Vijayvergiya C., Beal M. F., Buck J. and Manfredi G. (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Neurosci.* **25**, 2463–2470.
- Villalobo A. and Lehninger A. L. (1980) Inhibition of oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria and cells by intramitochondrial Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **255**, 2457–2464.
- Wang G. J., Jackson J. G. and Thayer S. A. (2003) Altered distribution of mitochondria impairs calcium homeostasis in rat hippocampal neurons in culture. *J. Neurochem.* **87**, 85–94.
- White R. J. and Reynolds I. J. (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* **16**, 5688–5697.
- Wong P. C., Pardo C. A., Borchelt D. R., Lee M. K., Copeland N. G., Jenkins N. A., Sisodia S. S., Cleveland D. W. and Price D. L. (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**, 1105–1116.
- Wu A. S., Kiaei M., Aguirre N., Crow J. P., Calingasan N. Y., Browne S. E. and Beal M. F. (2003) Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **85**, 142–150.
- Xu Z., Jung C., Higgins C., Levine J. and Kong J. (2004) Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 395–399.
- Zoratti M. and Szabo I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139–176.

X. Remarques de conclusion

X. La mitochondrie : perspectives de ciblage thérapeutique

p. 262

X. La mitochondrie : perspectives de ciblage thérapeutique

Les maladies de Huntington et de Parkinson sont des maladies orphelines, pour lesquelles à ce jour aucune thérapie pharmacologique ne permet de ralentir la dégénérescence neuronale.

En ce qui concerne la MH, les traitements médicamenteux actuellement utilisés, purement symptomatiques, visent à contrôler les troubles cinétiques et psychiatriques.

Bien que les médicaments classiques et ceux en phase d'expérimentation (tableau 15) améliorent certaines manifestations de la maladie, comme les troubles psychiatriques et les troubles du mouvement (revu dans Armstrong MJ and Miyasaki JM, 2012), il manque à ce jour des traitements contrecarrant réellement la dégénérescence des neurones. Aujourd'hui la thérapie "réparatrice" de remplacement de cellules par la greffe de neurones est celle qui génère le plus d'espoir.

| | |
|---|--|
| Dyskinésies choréïques | Antagonistes de la dopamine Réserpine Tetrabenazine Perfenazine Aloperidole Sulpiride Mesures ergonomiques |
| Rigidité (typique des formes juvéniles) | Médicaments anti-parkinsoniens Agonistes de la dopamine |
| Troubles psychiatriques et comportementaux | Neuroleptiques Sels des Litium Médicaments anti-dépressifs Anti-dépressifs tricycliques Médicaments serotoninergique Anti-épileptiques (carbamazepine) Soutien psychologique |
| En phase d'expérimentation Médicaments | Anti-glutamatergiques (Amantadine; Riluzole) Metabolites énergétiques (CoQ; Creatine; ω-fatty acids (ethyl-EPA) |
| Chirurgie | Anti-Oxydants : resveratrol; (+TEMPOL dans les animaux) Anti-inflammatoires Mynocycline (Triterpenoides expérimentés dans les modèles animaux) Greffe de cellules souches fœtales |

Tableau 15 : stratégies thérapeutiques utilisées pour le traitement de la MH. Des études RCT (pour *Randomised Control Trials*) de class I ou II témoignent de l'efficacité de médicaments en phase d'expérimentations sur les troubles moteurs (revu dans Armstrong MJ and Miyasaki JM, 2012)

Egalement, en ce qui concerne la MP (tableau 16), la thérapie pharmacologique actuellement utilisée est purement symptomatique ; les traitements chirurgicaux visant à modifier la fonctionnalité de la boucle cortico-striato-pallido-thalamo-corticale sont relativement efficaces, mais ils restent coûteux et donc d'applicabilité limitée.

| | |
|---|---|
| Médicaments anti-parkinsoniens | L-Dopa (Dihydroxy-Phenylalanine) Agonistes de la dopamine Médicaments réduisant le 'turnover' de la Dopamine Anti-cholinergiques |
| Autres | Amantadine Piribéridil (anti-dopaminergique, utilisé dans les formes à prédominance tremblante) |
| Traitements non pharmacologiques | Rééducation fonctionnelle Kinésithérapie active Mesures ergonomiques Soutien psychologique |
| Traitements chirurgicaux Modifiant le fonctionnement de la boucle cortico-striato-pallido-thalamo-corticale | Implantation d'électrodes Pour la stimulation chronique du noyau sous-thalamique ou GPi Lésion ou stimulation chronique à haute fréquence du noyau ventral intermédiaire du thalamus (pour le tremblement) |
| En phase d'expérimentation Médicaments Remplacement des cellules dégénérées | Anti-glutamatergiques Remacemide Métabolites énergétiques CoQ; Creatine Anti-oxydants (SS-31 et -20 dans les animaux) Anti-inflammatoires Mynocycline Greffe de cellules souches fœtales |

Tableau 16 : Stratégies thérapeutiques utilisées pour le traitement de la MP. Des études RCT de classe I ou II témoignent de l'efficacité de médicaments en phase d'expérimentations sur les troubles moteurs (revu dans Chaturvedi RA and Beal MF, 2013)

Comme pour la MH, la transplantation de cellules souches fœtales, reste à ce jour un traitement prometteur ; toutefois de nombreuses problématiques d'ordre technique et éthique empêchent l'application de cette stratégie sur large échelle.

La recherche orientée à définir le rôle de la mitochondrie au cours des maladies neurodégénératives a aussi fourni la base pour la découverte et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. De multiples stratégies pharmacologiques améliorant la fonction mitochondriale sont en cours d'expérimentation dans les essais cliniques. Celles-ci utilisent des métabolites énergétiques, tels que le Coenzyme Q (CoQ), la créatine ou les acides gras, et se sont révélées efficaces dans l'amélioration de certains troubles du mouvement dans la MH et dans la MP (revu dans Chaturvedi RA and Beal MF, 2013; Armstrong MJ and Myasaki JM, 2012). Le CoQ est, en effet, une molécule liposoluble, qui stabilise les membranes, et de facile administration. Son potentiel comme agent neuroprotecteur a été testé sur les patients atteints de différentes maladies neurodégénératives. En ce qui concerne la MH, actuellement deux études cliniques sont en cours : une première étude multicentrique randomisée, en double aveugle, est en phase II d'expérimentation pour tester la tolérance à de doses élevées de CoQ (600 à 2400 mg par jour) chez des sujets au stade presymptomatique, porteurs d'expansions pathologiques du trait CAGn ; le deuxième étude à long terme, randomisée et en double aveugle, vise à examiner si le CoQ est efficace dans le ralentissement de l'aggravation de la MH (revu dans Burgunder JM, 2013).

De manière similaire l'efficacité, en tant qu'agent neuroprotecteur, de la créatine a été expérimentée dans les protocoles cliniques de plusieurs maladies neurodégénératives. La créatine est un donneur de phosphate à haute énergie. Chez les patients atteints de MH, l'administration de créatine à la dose de 8g par jour a été bien tolérée, et améliore un des paramètres indicateurs du stress oxydant (les niveaux sériques de 8OH2'dG) (Hersch SM *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la MP l'administration CoQ, en association avec la Vit E (1,200 IU/jour), s'est révélée efficace ; les améliorations plus prononcées étant corrélées à l'administration de hautes doses de CoQ₁₀ (1,200 mg/jour) concernent les activités de la vie quotidienne (UPDRS partie II : réduction de 44% du déclin fonctionnel) (Shults CW *et al.*, 2002).

Egalement, l'association de l'anti-inflammatoire mynocyline et de la Créatine a été expérimentée avec succès sur les patients MP, démontrant une bonne tolérance chez les patients et une amélioration de l'UPDRS (revu dans Chaturvedi RA and Beal MF, 2013).

A ce jour, des stratégies plus spécifiques, ciblant presque tous les aspects de la fonction mitochondriale dont on a parlé dans les chapitres précédents, sont en cours d'expérimentations. L'augmentation des niveaux de PGC-1 α a été obtenue par l'utilisation du resveratrol, un inducteur de la deacétylase SIRT1. En alternative, les thiazolidinediones comme le pioglitazone et le bézafibrate, un pan-agoniste de PPAR, se sont révélés utiles comme agents neuroprotecteurs dans des modèles cellulaires et animaux. En particulier, par l'utilisation du bézafibrate, une amélioration des performances motrices, de la survie, de l'atrophie striatale et des MSNs a été mise en évidence (Johri A *et al.*, 2012). L'impact positif du bézafibrate, a été constaté aussi au niveau musculaire, où la diminution des fibres de type I s'est révélée moins dramatique à la suite de son administration, et dans le tissu adipeux avec amélioration de la vacuolisation lipidique.

Plusieurs autres stratégies pour augmenter les niveaux et la fonctionnalité de PGC-1 α ont été expérimentées dans des modèles de dégénérescence musculaire. L'étude de la mitochondrie est d'approche plus facile dans le muscle squelettique, qui d'ailleurs se montre compromis au cours de plusieurs maladies neurodégénératives, y compris la MH. Les glucocorticoïdes, les inhibiteurs du système microtubulaire, comme la colchicine ou le taxol, les inhibiteurs de la synthèse protéique, ou encore les agents inducteurs de l'AMPK, kinase dépendante de l'AMPc, se sont tous révélés très prometteurs vis-à-vis de la fonction du muscle squelettique. Ces agents ont été utilisés en alternative aux stratégies de transfert de gènes afin d'augmenter l'expression du gène codant pour PGC-1 α (Handschin C *et al.*, 2007; Arany Z *et al.*, 2008; Chaturvedi RK *et al.*, 2009; Xu W *et al.*, 2011). Les agents antioxydants ciblés à la mitochondrie (les peptides antioxydants, SS31 et SS20, pour la MP, et la molécule antioxydante synthétique XJB-5-131, pour la MH) se sont aussi révélés prometteurs dans la prévention des phénomènes d'apoptose, nécrose et stress oxydant (revu dans Chaturvedi RK and Beal MF 2013).

Les activateurs de la voie de signalisation Nrf2/ARE (Antioxidant Response Element), comme les triterpénoïdes, exercent des effets neuroprotecteurs dans les modèles animaux de MH et de MP : ces agents augmentent la motricité et la survie dans les modèles transgéniques murins de MH, et atténuent la perte neuronale dans les modèles toxiques de

MH et MP, induite respectivement par administration de 3-NP et MPTP (revu dans Chaturvedi RK and Beal MF 2013).

Enfin, un futur dans le développement des stratégies visant à manipuler pharmacologiquement la dynamique mitochondriale et le rapport entre la fusion et la fission est envisageable. En effet il existe des molécules qui ciblent ces processus, comme le quinazolinone, un inhibiteur de la division mitochondriale (mdiv1 pour mitochondrial division inhibitor 1), qui dans les expérimentations *in vitro* et *in vivo* a un effet neuroprotecteur qui contrecarrent les phénomènes d'excitotoxicité et l'augmentation du stress oxydant (Cassidy-Stone et al., 2008; Grohm J *et al.*, 2012; Slupe AM *et al.*, 2013). Cette stratégie est potentiellement utile dans le traitement de plusieurs affections neurologiques, y compris les accidents vasculaires cérébraux et la neurodégénérescence. Le rôle de la mitochondrie et des applications thérapeutiques la concernant présente autant de facettes, allant bien au-delà de la simple synthèse et de la distribution de l'ATP dans les cellules.

Dans mon projet concernant la MH, nous proposons déjà une stratégie qui, par transfert de gènes, améliore la fonction mitochondriale et fournit une neuroprotection efficace contre la toxicité causée par la HTT mutée. En outre, les autres données obtenues au cours du développement du même projet impliquent un rôle de PGC-1 α dans la MH.

Dans mon projet concernant la MP, je me focalise sur des aspects de la physiologie mitochondriale, comme la fission et la mitophagie, qui suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêt. Toutefois l'enthousiasme de la recherche doit être mitigé. Par exemple, si les données obtenues des modèles animaux et cellulaires indiquent un rôle primaire des protéines Parkine et PINK1 dans ces aspects de la physiologie mitochondriale, à ce jour il manquent encore des preuves concrètes de l'importance des ces mêmes aspects dans les tissus nerveux des patients atteints des différentes formes de MPF ou de MP sporadique. La disponibilité d'agents pharmacologiques visant à leur manipulation représente en soi une motivation pour les explorer.

Table des figures

| | |
|---|-------|
| Figure 1. Schéma représentatif de la distribution des séquences des trinuécléotides dont l'expansion est responsable de troubles héréditaires. | p.17 |
| Figure 2. Attitude Camptocormique. | p.24 |
| Figure 3. Représentation des Ganglions de la Base dans le cerveau humain. | p.40 |
| Figure 4. Schéma représentatif de la boucle cortico-striato-pallido-thalamo-corticale. | p.45 |
| Figure 5. Aspect macroscopique d'un cerveau d'un patient atteint de MH. | p.49 |
| Figure 6. Les corps de Lewy (LBs), les stigmates histopathologiques de la MP. | p.53 |
| Figure 7. Réactions de formation des EROs (1-4) et des ERAs. | p.57 |
| Figure 8. Réactions catalysées par les enzymes antioxydants. | p.58 |
| Figure 9. Récepteurs glutamatergiques. | p.63 |
| Figure 10. Réponse microgliale et astrogliale au cours de la pathogenèse de la MP. | p.72 |
| Figure 11. Structure de la Huntingtine. | p.77 |
| Figure 12. La HTT sauvage interagit avec Sp1/TAF4 sur les promoteurs des gènes cibles. | p.82 |
| Figure 13. La fonction de HIP1 dans l'endocytose clathrine dépendante. | p.87 |
| Figure 14. La phosphorylation de la HTT joue un rôle de commutateur de diréctionnalité du transport axonal. | p.89 |
| Figure 15. Représentation schématique de l'apoptose. | p.92 |
| Figure 16. Les différents stades de l'autophagie. | p.101 |
| Figure 17. Génération des modèles de zebrafish par la stratégie morpholino. | p.109 |
| Figure 18. Structure de l' α -synucléine et mutations pathogéniques. | p.113 |
| Figure 19. Représentation de la diffusion des altérations neuropathologiques dans la MP | p.115 |
| Figure 20. Le système UPS. | p.119 |
| Figure 21. Structure de Parkine et mutations pathogéniques. | p.121 |
| Figure 22. Structure de DJ- et mutations pathogéniques. | p.129 |
| Figure 23. Structure de PINK1 et mutations pathogéniques. | p.130 |
| Figure 24. Le cycle de SNARE dans la fusion des membranes. | p.132 |
| Figure 25. Diagramme schématique de la voie de signalisation AKT/mTOR. | p.136 |
| Figure 26. Structure de la mitochondrie. | p.143 |
| Figure 26. Diagramme représentatif des principales étapes métaboliques ayant lieu au niveau de la mitochondrie. | p.146 |
| Figure 28. Diagramme représentatif du cycle de Krebs | p.148 |
| Figure 29. Schéma d'une partie des mécanismes de régulation de la concentration du Ca^{2+} dans la mitochondrie. | p.157 |
| Figure 30. Interaction entre les co-activateurs de la famille PGC-1 et les facteurs de transcription spécifiques, orchestrant les fonctions mitochondriales d'importance primaire. | p.160 |

| | |
|---|-------|
| Figure 31. Mécanismes proposés pour une action de la HTT mutée sur la fonction ou l'expression de PGC-1 α au cours de la MH. | p.162 |
| Figure 32. Modèle proposé pour la fusion et la dynamique mitochondriales. | p.165 |
| Figure 33. Modèle hypothétique pour l'assemblage des protéines de la machinerie de fission mitochondriale. | p.168 |
| Figure 34. Mécanisme de la mitophagie induite par activation de la voie PINK1/Parkine. | p.175 |
| Figure 35. Le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. | p.180 |
| Figure 36. Fragment de micro-injection et identification des sites d'intégration du transgène pour le modèle R6. | p.185 |
| Figure 37. Plasmide codant le fragment HD –N171. | p.186 |
| Figure 38. Représentation des transgènes insérés dans les vecteurs lentiviraux. | p.189 |
| Figure 39. Séquence d'un vecteur lentiviral inactivé utilisé dans notre étude. | p.190 |
| Figure 40. Exemple d'une courbe de respiration. | p.194 |
| Figure 41. Illustration de la préparation des gels de gradient. | p.198 |
| Figure 42. Exemple de mise au point de la méthode BN-PAGE pour l'isolement des complexes mitochondriaux. | p.200 |
| Figure 43. Exemple de courbe de PCR quantitative | p.204 |
| Figure 44. Illustration de la procédure de dissection de la région striatale infectée par un vecteur lentiviral codant la GFP. | p.207 |
| Figure 45. Résultats du transfert des gènes, fait à l'aide de vecteurs lentiviraux, codants le fragment N171 de la HTT contenant 18 ou 82 répétitions CAG dans le striatum des rats. | p.211 |
| Figure 46. Plan de travail sur le modèle de rat d'expression striatale du fragment N171-82Q de la HTT mutée obtenue par transfert de gène à l'aide d'un lentivirus. | p.212 |
| Figure 47. Résultats de l'analyse BN-PAGE des mitochondries de cerveau de souris NLS-N171-82Q âgées d'un mois. | p.217 |
| Figure 48. Résultats de l'analyse BN-PAGE des mitochondries de cerveau de souris NLS-N171-82Q âgées d'un mois. | p.217 |
| Figure 49. Quantification de l'ADN mitochondrial dans la lignée cellulaire STHDH ^{Q111} . | p.220 |
| Figure 50. Diminution progressive du contenu en ADN mitochondrial et des ARNs messagères de PGC-1 α et NRF1 dans le modèle BACHD. | p.221 |
| Figure 51. Illustration et schématisation de la procédure utilisée pour la quantification des paramètres Aspect ratio et Form factor, indicatifs de la morphologie mitochondriale | p.229 |
| Figure 52. Mécanismes d'ARN interférence et machinerie RISC (<u>R</u> NA- <u>I</u> nduced <u>S</u> ilencing <u>C</u> omplex). | p.230 |
| Figure 53. Naissance des shRNAs et maturation en siRNAs. | p.231 |
| Figure 54. Le concept de FRET. | p.233 |
| Figure 55. Diagramme illustrant les voies de signalisation qui règlent l'activité de Drp1 | p.236 |
| Figure 56. La Parkine induit la fission mitochondriale en présence et en absence de PINK1. | p.237 |
| Figure 57. La Parkine induit la fission mitochondriale en présence et en absence de PINK1. Analyse à 48h. | p.238 |

| | |
|---|-------|
| Figure 58. Diagramme 1 illustrant le plan expérimental du Projet II. | p.240 |
| Figure 59. Diagramme 2 illustrant le plan expérimental du Projet II. | p.241 |
| Figure 60. Diagramme 3 illustrant le plan expérimental du Projet II. | p.242 |
| Figure 61. Exemple d'une courbe de consommation d'oxygène obtenu par le système Oroboros, à partir de l'homogénat de striatum d'une souris contrôle. | p.250 |
| Figure 62. Représentation du système « XF Extracellular Flux Analyzer ». | p.251 |
| Figure 63. Schématisation des essais cinétiques pour la mesure des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. | p.252 |
| Figure 64. Exemples de courbes de la capacité de stockage du Ca ²⁺ des mitochondries de cerveau. | p.258 |

Table des tableaux

| | |
|--|--------|
| Tableau 1. Description succincte des maladies à polyQ. | p. 18 |
| Tableau 2. Liste des <i>loci</i> et des principales caractéristiques cliniques associés aux formes héréditaires de MP. | p.34 |
| Tableau 3. Modèles des souris KO pour les principaux gènes associés aux formes récessives de MPF. | p.107 |
| Tableau 4. Modèles des souris doubles ou triples transgéniques existant pour étudier la fonction gènes associés à la MPF. | p. 107 |
| Tableau 5. Résumé des défauts de la phosphorylation oxydative relevés dans les différents modèles de MPF associés à l'altération de la fonction de Parkine et PINK1 | p. 154 |
| Tableau 6. Résumé des résultats majeures obtenus dans le cadre de la caractérisation des fonctions mitochondriales sur les patients atteints de MH et les modèles transgéniques | p. 178 |
| Tableau 7. Modèles transgéniques exprimant des fragments N-terminaux de la HTT mutée. | p. 183 |
| Tableau 8. Modèles knock in (KI) exprimant la HTT mutée entière. | p. 184 |
| Tableau 9. Modèles transgéniques exprimant la HTT mutée entière. | p. 184 |
| Tableau 10. Principaux virus utilisés dans le transfert de gènes dans la MH. | p. 188 |
| Tableau 11. Composition des solutions nécessaires à la préparation et à la migration électrophorétique d'un gel BN. | p. 197 |
| Tableau 12. Schéma pour la préparation d'un gel de gradient 5-13%, pour le BN-PAGE. | p. 198 |
| Tableau 13. Composition du Mix pour un essai de RT-PCR | p. 203 |
| Tableau 14. Résumé des études qui ont exploré l'effet de la surexpression ou de l'inactivation des gènes <i>PARK2</i> et <i>PARK6</i> sur la morphologie mitochondriale. | p. 225 |
| Tableau 15. Stratégies thérapeutiques utilisées pour le traitement de la MH. | p. 262 |
| Tableau 16. Stratégies thérapeutiques utilisées pour le traitement de la MP. | p. 263 |

XI. BIBLIOGRAPHIE

A-

Aarsland, D., Bronnick, K., Ehrt, U., De Deyn, P.P., Tekin, S., Emre, M., Cummings, J.L., 2007. Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated caregiver stress. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78, 36-42.

Aarsland, D., Ballard, C., McKeith, I., Perry, R.H., Larsen, J.P., 2001. Comparison of extrapyramidal signs in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 13, 374-379.

Abada, Y.S., Nguyen, H.P., Schreiber, R., Ellenbroek, B., 2013. Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel BACHD transgenic rat model for huntington disease. *PLoS one* 8, e68584.

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., Rosenthal, A., 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-252.

Adam-Vizi, V., 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1140-1149.

Agid, Y., Ruberg, M., Javoy-Agid, F., Hirsch, E., Raisman-Vozari, R., Vyas, S., Faucheux, B., Michel, P., Kastner, A., Blanchard, V., et al., 1993. Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? *Advances in neurology* 60, 148-164.

Agid, Y., Graybiel, A.M., Ruberg, M., Hirsch, E., Blin, J., Dubois, B., Javoy-Agid, F., 1990. The efficacy of levodopa treatment declines in the course of Parkinson's disease: do nondopaminergic lesions play a role? *Advances in neurology* 53, 83-100.

Agier V., Oliviero P., Laine J., L'Hermitte-Stead C., Girard S., Fillaut S., Jardel C., Bouillaud F., Bulteau A.L., Lombes A., 2012. Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations, *Biochim Biophys Acta* 1822; 1570-1580.

Aidt, F.H., Nielsen, S.M., Kanters, J., Pesta, D., Nielsen, T.T., Norremolle, A., Hasholt, L., Christiansen, M., Hagen, C.M., 2013. Dysfunctional mitochondrial respiration in the striatum of the Huntington's disease transgenic R6/2 mouse model. *PLoS currents* 5.

Aiken, C.T., Steffan, J.S., Guerrero, C.M., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Simmons, D., Purcell, J.M., Menhaji, K., Zhu, Y.Z., Green, K., Laferla, F., Huang, L., Thompson, L.M., Marsh, J.L., 2009. Phosphorylation of threonine 3: implications for Huntingtin aggregation and neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 284, 29427-29436.

Aizman, O., Brismar, H., Uhlen, P., Zettergren, E., Levey, A.I., Forsberg, H., Greengard, P., Aperia, A., 2000. Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nature neuroscience* 3, 226-230.

Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences* 12, 366-375.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences* 13, 266-271.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D., DeLong, M.R., 1990. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progress in brain research* 85, 119-146.

Ali, D.W., Salter, M.W., 2001. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Current opinion in neurobiology* 11, 336-342.

Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179.

Aloisi, F., Serafini, B., Adorini, L., 2000. Glia-T cell dialogue. *Journal of neuroimmunology* 107, 111-117.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7915-7922.

Amitai, Y., 2010. Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. *Glia* 58, 1775-1781.

Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, A.M., Toyomizu, M., Gautier, C.A., Shen, J., Ohta, S., Hattori, N., 2011. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiology of disease* 41, 111-118.

Andersson, U., Scarpulla, R.C., 2001. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 21, 3738-3749.

Andrade, M.A., Bork, P., 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics* 11, 115-116.

Andres-Mateos, E., Perier, C., Zhang, L., Blanchard-Fillion, B., Greco, T.M., Thomas, B., Ko, H.S., Sasaki, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2007. DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14807-14812.

Andrews, T.C., Weeks, R.A., Turjanski, N., Gunn, R.N., Watkins, L.H., Sahakian, B., Hodges, J.R., Rosser, A.E., Wood, N.W., Brooks, D.J., 1999. Huntington's disease progression. PET and clinical observations. *Brain* 122 (Pt 12), 2353-2363.

Anglade, P., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E., 1996. Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 5, 121-128.

Anglade, P., Tsuji, S., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Hirsch, E.C., 1995. Plasticity of nerve afferents to nigrostriatal neurons in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 37, 265-272.

Anichtchik, O., Diekmann, H., Fleming, A., Roach, A., Goldsmith, P., Rubinsztein, D.C., 2008. Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. *J Neurosci* 28, 8199-8207.

Antonini, A., Leenders, K.L., Spiegel, R., Meier, D., Vontobel, P., Weigell-Weber, M., Sanchez-Pernaute, R., de Yebenez, J.G., Boesiger, P., Weindl, A., Maguire, R.P., 1996. Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *Brain* 119 (Pt 6), 2085-2095.

Arany Z., Wagner B.W., Ma Y., Chinsomboon J., Laznik D., Spiegelman B.M., 2008. Gene expression-based identifies microtubule inhibitors as inducers of PGC-1 α and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 25; 105(12): 4721–4726. Published online Mar 17, 2008.

Archer, T., Neurodegeneration in schizophrenia. *Expert review of neurotherapeutics* 10, 1131-1141.

Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martin, M.A., Rubio, J.C., Ablanedo, P., Cabello, A., 1998. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Annals of neurology* 43, 397-400.

Armstrong, M.J., Miyasaki, J.M., 2012. Evidence-based guideline: pharmacologic treatment of chorea in Huntington disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 79, 597-603.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schagger, H., 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO journal* 17, 7170-7178.

Arnulf, I., Nielsen, J., Lohmann, E., Schiefer, J., Wild, E., Jennum, P., Konofal, E., Walker, M., Oudiette, D., Tabrizi, S., Durr, A., 2008. Rapid eye movement sleep disturbances in Huntington disease. *Archives of neurology* 65, 482-488.

Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., Finkbeiner, S., 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805-810.

Atwal, R.S., Desmond, C.R., Caron, N., Maiuri, T., Xia, J., Sipione, S., Truant, R., 2011. Kinase inhibitors modulate huntingtin cell localization and toxicity. *Nature chemical biology* 7, 453-460.

Atwal, R.S., Xia, J., Pinchev, D., Taylor, J., Epan, R.M., Truant, R., 2007. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Human molecular genetics* 16, 2600-2615.

Avidor, T., Clementi, E., Schwartz, L., Atlas, D., 1994. Caffeine-induced transmitter release is mediated via ryanodine-sensitive channel. *Neuroscience letters* 165, 133-136.

Aziz, N.A., van der Burg, J.M., Landwehrmeyer, G.B., Brundin, P., Stijnen, T., Roos, R.A., 2008. Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. *Neurology* 71, 1506-1513.

Aziz, N.A., Swaab, D.F., Pijl, H., Roos, R.A., 2007. Hypothalamic dysfunction and neuroendocrine and metabolic alterations in Huntington's disease: clinical consequences and therapeutic implications. *Reviews in the neurosciences* 18, 223-251.

B-

Babior, B.M., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.

Backman, L., Robins-Wahlin, T.B., Lundin, A., Ginovart, N., Farde, L., 1997. Cognitive deficits in Huntington's disease are predicted by dopaminergic PET markers and brain volumes. *Brain* 120 (Pt 12), 2207-2217.

Bae, B.I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., Snyder, S.H., Sawa, A., 2005. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47, 29-41.

Bagheri, H., Damase-Michel, C., Lapeyre-Mestre, M., Cismondo, S., O'Connell, D., Senard, J.M., Rascol, O., Montastruc, J.L., 1999. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology* 22, 213-215.

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y., Patterson, C., 1999. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Molecular and cellular biology* 19, 4535-4545.

Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., White, A.D., Bossy, B., Martinou, J.C., Youle, R.J., Lipton, S.A., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., Bossy-Wetzel, E., 2006. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *The EMBO journal* 25, 3900-3911.

Baxa, M. (2013). A transgenic minipig model of Huntington's disease. *J. Huntingtons Dis.* 2, 47–68.

Beal, M.F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2, 325-334.

Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Miller, J.M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B.R., Hyman, B.T., 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13, 4181-4192.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Swartz, K.J., Ferrante, R.J., Martin, J.B., 1988. Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J Neurosci* 8, 3901-3908.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., Martin, J.B., 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321, 168-171.

Becker, E.B., Bonni, A., 2004. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Progress in neurobiology* 72, 1-25.

Behrens, M.I., Bruggemann, N., Chana, P., Venegas, P., Kagi, M., Parrao, T., Orellana, P., Garrido, C., Rojas, C.V., Hauke, J., Hahnen, E., Gonzalez, R., Seleme, N., Fernandez, V., Schmidt, A., Binkofski, F., Kompf, D., Kubisch, C., Hagenah, J., Klein, C., Ramirez, A., 2010. Clinical spectrum of Kufor-Rakeb syndrome in the Chilean kindred with ATP13A2 mutations. *Mov Disord* 25, 1929-1937.

Bembi, B., Zambito Marsala, S., Sidransky, E., Ciana, G., Carrozzi, M., Zorzon, M., Martini, C., Gioulis, M., Pittis, M.G., Capus, L., 2003. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. *Neurology* 61, 99-101.

Benard, G., Karbowski, M., 2009. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 365-374.

Bence, N.F., Sampat, R.M., Kopito, R.R., 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science (New York, N.Y)* 292, 1552-1555.

Benchoua, A., Trioulier, Y., Diguët, E., Malgorn, C., Gaillard, M.C., Dufour, N., Elalouf, J.M., Krajewski, S., Hantraye, P., Deglon, N., Brouillet, E., 2008. Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Human molecular genetics* 17, 1446-1456.

Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.M., Hirsch, E., Hantraye, P., Deglon, N., Brouillet, E., 2006. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Molecular biology of the cell* 17, 1652-1663.

Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics* 38, 515-517.

Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H., Kopito, R.R., 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448, 704-708.

Bennett, M.C., Bishop, J.F., Leng, Y., Chock, P.B., Chase, T.N., Mouradian, M.M., 1999. Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *The Journal of biological chemistry* 274, 33855-33858.

Bereiter-Hahn, J., Voth, M., Mai, S., Jendrach, M., 2008. Structural implications of mitochondrial dynamics. *Biotechnology journal* 3, 765-780.

Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human molecular genetics* 15, 433-442.

Bertolin G., Ferrando-Miguel R., Jacoupy M., Traver S., Grenier K., Greene A.W., Dauphin A., Waharte F., Bayot A., Salamero J., Lombès A., Bulteau A.L., A.F. Fon, Brice A., Corti O., 2013. The TOM machinery is a molecular switch in PINK1/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. *Autophagy* 9:11, 1801-1817.

Bertoncini, C.W., Fernandez, C.O., Griesinger, C., Jovin, T.M., Zweckstetter, M., 2005. Familial mutants of alpha-synuclein with increased neurotoxicity have a destabilized conformation. *The Journal of biological chemistry* 280, 30649-30652.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 3, 1301-1306.

Bett, J.S., Benn, C.L., Ryu, K.Y., Kopito, R.R., Bates, G.P., 2009. The polyubiquitin Ubc gene modulates histone H2A monoubiquitylation in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 2645-2657.

Bevan, M.D., Bolam, J.P., 1995. Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 15, 7105-7120.

Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P., Wetzel, R., 2006. Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *Journal of molecular biology* 355, 524-535.

Bilguvar, K., Tyagi, N.K., Ozkara, C., Tuysuz, B., Bakircioglu, M., Choi, M., Delil, S., Caglayan, A.O., Baranoski, J.F., Erturk, O., Yalcinkaya, C., Karacorlu, M., Dincer, A., Johnson, M.H., Mane, S., Chandra, S.S., Louvi, A., Boggon, T.J., Lifton, R.P., Horwich, A.L., Gunel, M., 2013. Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 3489-3494.

Biousse, V., Skibell, B.C., Watts, R.L., Loupe, D.N., Drews-Botsch, C., Newman, N.J., 2004. Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology* 62, 177-180.

Bird, E.D., Spokes, E.G., Iversen, L.L., 1980. Dopamine and noradrenaline in post-mortem brain in Huntington's disease and schizophrenic illness. *Acta psychiatrica Scandinavica* 280, 63-73.

Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., 1998. The effect of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism & related disorders* 4, 59-60.

Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., 1961. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wiener klinische Wochenschrift* 73, 787-788.

Bizat, N., Hermel, J.M., Boyer, F., Jacquard, C., Creminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Kajewski, S., Brouillet, E., 2003. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23, 5020-5030.

Bjorklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Fifty years of dopamine research. *Trends in neurosciences* 30, 185-187.

Björklund A., and Lindvall O. (1984). Dopamine-containing systems in the CNS. *In "Handbook of chemical neuroanatomy, Vol.2: Classical transmitters in the CNS, Part I" (A. Björklund, and T. Hökfelt, Eds.), pp. 55-122, Elsevier.*

Bjorkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M.W., Brundin, P., Bates, G.P., Leavitt, B.R., Moller, T., Tabrizi, S.J., 2008. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *The Journal of experimental medicine* 205, 1869-1877.

Blin, O., Desnuelle, C., Rascol, O., Borg, M., Peyro Saint Paul, H., Azulay, J.P., Bille, F., Figarella, D., Coulom, F., Pellissier, J.F., et al., 1994. Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Journal of the neurological sciences* 125, 95-101.

Block-Galarza, J., Chase, K.O., Sapp, E., Vaughn, K.T., Vallee, R.B., DiFiglia, M., Aronin, N., 1997. Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP 1 in axons. *Neuroreport* 8, 2247-2251.

Bloem, B.R., Hausdorff, J.M., Visser, J.E., Giladi, N., 2004. Falls and freezing of gait in Parkinson's disease: a review of two interconnected, episodic phenomena. *Mov Disord* 19, 871-884

Bloem, B.R., 1992. Postural instability in Parkinson's disease. *Clinical neurology and neurosurgery* 94 Suppl, S41-45.

Blum, D., Galas, M.C., Gall, D., Cuvelier, L., Schiffmann, S.N., 2002. Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 10, 410-426.

Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., Cleveland, D.W., 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science (New York, N.Y)* 312, 1389-1392.

Bolam, J.P., Somogyi, P., Takagi, H., Fodor, I., Smith, A.D., 1983. Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *Journal of neurocytology* 12, 325-344.

Bonilla, E., 2000. [Huntington disease. A review]. *Investigacion clinica* 41, 117-141.

Borchelt, D.R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M.K., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Price, D.L., 1996. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal* 13, 159-163.

Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S., Saudou, F., 2006. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63, 2642-2660.

Bosgraaf, L., Van Haastert, P.J., 2003. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1643, 5-10.

Botella, J.A., Bayersdorfer, F., Gmeiner, F., Schneuwly, S., 2009. Modelling Parkinson's disease in *Drosophila*. *Neuromolecular medicine* 11, 268-280.

Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A.K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., Gasser, T., Augustin, R., Trumbach, D., Irrcher, I., Park, D.S., Wurst, W.,

Kilberg, M.S., Tatzelt, J., Winklhofer, K.F., 2011. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell death and differentiation* 18, 769-782.

Boutell, J.M., Thomas, P., Neal, J.W., Weston, V.J., Duce, J., Harper, P.S., Jones, A.L., 1999. Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Human molecular genetics* 8, 1647-1655.

Buttner, S., Habernig, L., Broeskamp, F., Ruli, D., Vogtle, F.N., Vlachos, M., Macchi, F., Kuttner, V., Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Ring, J., Markaki, M., Taskin, A.A., Benke, S., Ruckstuhl, C., Braun, R., Van den Haute, C., Bammens, T., van der Perren, A., Frohlich, K.U., Winderickx, J., Kroemer, G., Baekelandt, V., Tavernarakis, N., Kovacs, G.G., Dengjel, J., Meisinger, C., Sigrist, S.J., Madeo, F., 2013. Endonuclease G mediates alpha-synuclein cytotoxicity during Parkinson's disease. *The EMBO journal* 32, 3041-3054.

Braak H., de Vos R. A., Bohl J. & Del Tredici K., 2006 Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72 .

Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R.A., Jansen, E.N., Bohl, J., Jellinger, K., 1994. Amygdala pathology in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 88, 493-500.

Bradley, C.K., Scott, H.A., Chami, O., Peura, T.T., Dumevska, B., Schmidt, U., Stojanov, T., 2011. Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem cells and development* 20, 495-502.

Brandt, J., Folstein, S.E., Wong, D.F., Links, J., Dannals, R.F., McDonnell-Sill, A., Starkstein, S., Anders, P., Strauss, M.E., Tune, L.E., et al., 1990. D2 receptors in Huntington's disease: positron emission tomography findings and clinical correlates. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 2, 20-27.

Bretaud, S., Allen, C., Ingham, P.W., Bandmann, O., 2007. p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 100, 1626-1635.

Bronte-Stewart, H.M., Minn, A.Y., Rodrigues, K., Buckley, E.L., Nashner, L.M., 2002. Postural instability in idiopathic Parkinson's disease: the role of medication and unilateral pallidotomy. *Brain* 125, 2100-2114.

Brouillet E., Diguët E., García-Martínez J., Trioulier Y., Delzescaux T., Benchoua A., Petit F., Malgorn C., Dufour N., Hantraye P., Canals J., Alberch J. and Déglon N. (2008). Short N-terminal fragment of mutant huntingtin produces an early loss of mitochondrial complex II in vivo.

Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., Hantraye, P., 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in neurobiology* 59, 427-468.

Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N.W., Beal, M.F., 1995. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7105-7109.

Brouillet, E., Jenkins, B.G., Hyman, B.T., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Srivastava, R., Roy, D.S., Rosen, B.R., Beal, M.F., 1993. Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal of neurochemistry* 60, 356-359.

Browne, S.E., Ferrante, R.J., Beal, M.F., 1999. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 9, 147-163.

Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D., Beal, M.F., 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology* 41, 646-653.

Bruchelt, G., Schraufstatter, I.U., Niethammer, D., Cochrane, C.G., 1991. Ascorbic acid enhances the effects of 6-hydroxydopamine and H₂O₂ on iron-dependent DNA strand breaks and related processes in the neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Cancer research* 51, 6066-6072.

Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.

Buller, A.L., Larson, H.C., Schneider, B.E., Beaton, J.A., Morrisett, R.A., Monaghan, D.T., 1994. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* 14, 5471-5484.

Bunik, V.I., Sievers, C., 2002. Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 5004-5015.

Burchell, V.S., Nelson, D.E., Sanchez-Martinez, A., Delgado-Camprubi, M., Ivatt, R.M., Pogson, J.H., Randle, S.J., Wray, S., Lewis, P.A., Houlden, H., Abramov, A.Y., Hardy, J., Wood, N.W., Whitworth, A.J., Laman, H., Plun-Favreau, H., 2013. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nature neuroscience* 16, 1257-1265.

Burgunder JM 2013. Translational research in Huntington's disease: opening up for disease modifying treatment. *Translational Neurodegeneration* 2:2.

Burman, J.L., Yu, S., Poole, A.C., Decal, R.B., Pallanck, L., 2012. Analysis of neural subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 10438-10443.

Burre, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., Sudhof, T.C., 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y)* 329, 1663-1667.

Büttner S, Habernig L, Broeskamp F, Ruli D, Vögtle FN, Vlachos M, Macchi F, Küttner V, Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Ring J, Markaki M, Taskin AA, Benke S, Ruckenstein C, Braun R, Van den Haute C, Bammens T, van der Perren A, Fröhlich KU, Winderickx J, Kroemer G, Baekelandt V, Tavernarakis N, Kovacs GG, Dengjel J, Meisinger C, Sigrist SJ, Madeo F., 2013 Endonuclease G mediates α -synuclein cytotoxicity during Parkinson's disease. *EMBO J*. Nov 27;32(23):3041-54. Epub 2013 Oct 15.

Byrd, R.A., Weissman, A.M., 2013. Compact Parkin only: insights into the structure of an autoinhibited ubiquitin ligase. *The EMBO journal* 32, 2087-2089.

C-

Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., McIlwain, K.L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., Lu, B., Nussbaum, R.L., 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 22, 8797-8807.

Calabresi, P., Galletti, F., Saggese, E., Ghiglieri, V., Picconi, B., 2007. Neuronal networks and synaptic plasticity in Parkinson's disease: beyond motor deficits. *Parkinsonism & related disorders* 13 Suppl 3, S259-262.

Cali T., Ottolini D., Negro A., Brinin M., 2013. Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca²⁺ transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832 (2013) 495–508

Calkins, M.J., Vargas, M.R., Johnson, D.A., Johnson, J.A., 2010. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 protects striatal neurons from mitochondrial complex II inhibition. *Toxicol Sci* 115, 557-568.

Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., Cookson, M.R., 2004. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9103-9108.

Cann, R.L., Wilson, A.C., 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104, 699-711.

Canto, C., Auwerx, J., 2009. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current opinion in lipidology* 20, 98-105.

Caparros-Lefebvre, D., Elbaz, A., 1999. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Caribbean Parkinsonism Study Group. Lancet* 354, 281-286.

Carpenter, G., Ji, Q., 1999. Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Experimental cell research* 253, 15-24.

Carpenter M. (1981). Anatomy of the corpus striatum and brainstem integrating systems. *In* "Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System", pp. 947-995, American physiological Society, Bethesda, Maryland.

Casals, J., Elizan, T.S., Yahr, M.D., 1998. Postencephalitic parkinsonism--a review. *J Neural Transm* 105, 645-676.

Casarejos, M.J., Menendez, J., Solano, R.M., Rodriguez-Navarro, J.A., Garcia de Yébenes, J., Mena, M.A., 2006. Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *Journal of neurochemistry* 97, 934-946.

Cassidy-Stone, A., Chipuk, J.E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M.J., Shaw, J.T., Hinshaw, J.E., Green, D.R., Nunnari, J., 2008. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental cell* 14, 193-204.

Caviston, J.P., Zajac, A.L., Tokito, M., Holzbaur, E.L., 2011. Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Molecular biology of the cell* 22, 478-492.

Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., Holzbaur, E.L., 2007. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10045-10050.

Centonze, D., Gubellini, P., Rossi, S., Picconi, B., Pisani, A., Bernardi, G., Calabresi, P., Baunez, C., 2005. Subthalamic nucleus lesion reverses motor abnormalities and striatal glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Neuroscience* 133, 831-840.

Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P. and Scorrano, L., 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15803-15808.

Cha, J.H., 2007. Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Progress in neurobiology* 83, 228-248.

Cha, J.H., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P., Young, A.B., 1998. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6480-6485.

Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E., Surmeier, D.J., 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447, 1081-1086.

Chan, N.C., Chan, D.C., 2011. Parkin uses the UPS to ship off dysfunctional mitochondria. *Autophagy* 7, 771-772.

Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L., Hess, S., Chan, D.C., 2011. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human molecular genetics* 20, 1726-1737.

Chance, B., Williams, G.R., 1955. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* 175, 1120-1121.

Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O.M., Sudhof, T.C., 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383-396.

Chang, J.H., Tong, L., 2011. Mitochondrial poly(A) polymerase and polyadenylation. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 992-997.

Charvin, D., Roze, E., Perrin, V., Deyts, C., Betuing, S., Pages, C., Regulier, E., Luthi-Carter, R., Brouillet, E., Deglon, N., Caboche, J., 2008. Haloperidol protects striatal neurons from dysfunction induced by mutated huntingtin in vivo. *Neurobiology of disease* 29, 22-29.

Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borrelli, E., Caboche, J., 2005. Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12218-12223.

Chaturvedi, R.K., Beal, M.F., 2013. Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases. *Molecular and cellular neurosciences* 55, 101-114.

Chaturvedi, R.K., Hennessey, T., Johri, A., Tiwari, S.K., Mishra, D., Agarwal, S., Kim, Y.S., Beal, M.F., 2012. Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) transcription and function is impaired in Huntington's disease. *Human molecular genetics* 21, 3474-3488.

Chaturvedi, R.K., Calingasan, N.Y., Yang, L., Hennessey, T., Johri, A., Beal, M.F., 2010. Impairment of PGC-1alpha expression, neuropathology and hepatic steatosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease following chronic energy deprivation. *Hum Mol Genet.* Aug 15;19(16):3190-205. doi: 10.1093/hmg/ddq229. Epub 2010 Jun 7.

Chaturvedi, R.K., Adihetty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., Kiaei, M., Cannella, M., Sassone, J., Ciammola, A., Squitieri, F., Beal, M.F., 2009. Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* Aug 15;18(16):3048-65.

Chaugule, V.K., Burchell, L., Barber, K.R., Sidhu, A., Leslie, S.J., Shaw, G.S., Walden, H., 2011. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *The EMBO journal* 30, 2853-2867

Chen, C.M., Wu, Y.R., Cheng, M.L., Liu, J.L., Lee, Y.M., Lee, P.W., Soong, B.W., Chiu, D.T., 2007. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. *Biochemical and biophysical research communications* 359, 335-340.

Chen, L., Cagniard, B., Mathews, T., Jones, S., Koh, H.C., Ding, Y., Carvey, P.M., Ling, Z., Kang, U.J., Zhuang, X., 2005. Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *The Journal of biological chemistry* 280, 21418-21426.

Chen, N., Luo, T., Wellington, C., Metzler, M., McCutcheon, K., Hayden, M.R., Raymond, L.A., 1999. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *Journal of neurochemistry* 72, 1890-1898.

Chen, Q., Reiner, A., 1996. Cellular distribution of the NMDA receptor NR2A/2B subunits in the rat striatum. *Brain research* 743, 346-352.

Chen, Q., Veenman, C.L., Reiner, A., 1996. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience* 73, 715-731.

- Chen, R., Fearnley, I.M., Peak-Chew, S.Y., Walker, J.E., 2004. The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 279, 26036-26045.
- Chen, X., Wu, J., Lvovskaya, S., Herndon, E., Supnet, C., Bezprozvanny, I., 2011. Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model. *Molecular neurodegeneration* 6, 81.
- Chen, Y., Dorn, G.W., 2nd, 2013. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science (New York, N.Y)* 340, 471-475.
- Chin, S.S., Goldman, J.E., 1996. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55, 499-508.
- Chinta, S.J., Andersen, J.K., 2008. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 1362-1367.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Lipton, S.A., 2010. Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 67, 3435-3447.
- Choi, D.H., Cristovao, A.C., Guhathakurta, S., Lee, J., Joh, T.H., Beal, M.F., Kim, Y.S., 2012. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1033-1045.
- Choi, J., Levey, A.I., Weintraub, S.T., Rees, H.D., Gearing, M., Chin, L.S., Li, L., 2004. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *The Journal of biological chemistry* 279, 13256-13264.
- Choi, P., Golts, N., Snyder, H., Chong, M., Petrucelli, L., Hardy, J., Sparkman, D., Cochran, E., Lee, J.M., Wolozin, B., 2001. Co-association of parkin and alpha-synuclein. *Neuroreport* 12, 2839-2843.
- Choi, W.S., Palmiter, R.D., Xia, Z., 2011. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *The Journal of cell biology* 192, 873-882.
- Choo, Y.S., Johnson, G.V., MacDonald, M., Detloff, P.J., Lesort, M., 2004. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human molecular genetics* 13, 1407-1420.
- Chung, K.K., Thomas, B., Li, X., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Marsh, L., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2004. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science (New York, N.Y)* 304, 1328-1331.
- Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2001. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature medicine* 7, 1144-1150.
- Cicchetti, F., Gould, P.V., Parent, A., 1996. Sparing of striatal neurons coexpressing calretinin and substance P (NK1) receptor in Huntington's disease. *Brain research* 730, 232-237.

Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L., De Strooper, B., 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163-175.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., Scorrano, L., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15927-15932.

Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., Guo, M., 2006. *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162-1166.

Clegg, R.M., 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Current opinion in biotechnology* 6, 103-110.

Clemens, M.J., 2001. Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins. *Journal of cellular and molecular medicine* 5, 221-239.

Clements, C.M., McNally, R.S., Conti, B.J., Mak, T.W., Ting, J.P., 2006. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15091-15096.

Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pages, M., Li, X.J., Saudou, F., Humbert, S., 2008. Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO journal* 27, 2124-2134.

Colin, E., Regulier, E., Perrin, V., Durr, A., Brice, A., Aebischer, P., Deglon, N., Humbert, S., Saudou, F., 2005. Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *The European journal of neuroscience* 21, 1478-1488.

Comella, C.L., 2007. Sleep disorders in Parkinson's disease: an overview. *Mov Disord* 22 Suppl 17, S367-373.

Comella, C.L., Goetz, C.G., 1994. Akathisia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 9, 545-549.

Conaco, C., Otto, S., Han, J.J., Mandel, G., 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2422-2427.

Conkright, M.D., Canettieri, G., Sreaton, R., Guzman, E., Miraglia, L., Hogenesch, J.B., Montminy, M., 2003. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Molecular cell* 12, 413-423.

Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M., Lansbury, P.T., Jr., 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science (New York, N.Y.)* 294, 1346-1349.

Coon, M.J., 2002. Enzyme ingenuity in biological oxidations: a trail leading to cytochrome p450. *The Journal of biological chemistry* 277, 28351-28363.

Cooper, J.A., Sagar, H.J., Tidswell, P., Jordan, N., 1994. Slowed central processing in simple and go/no-go reaction time tasks in Parkinson's disease. *Brain* 117 (Pt 3), 517-529.

Cooper, O., Hargus, G., Deleidi, M., Blak, A., Osborn, T., Marlow, E., Lee, K., Levy, A., Perez-Torres, E., Yow, A., Isacson, O., 2010. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPSC cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Molecular and cellular neurosciences* 45, 258-266.

Cornett, J., Cao, F., Wang, C.E., Ross, C.A., Bates, G.P., Li, S.H., Li, X.J., 2005. Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nature genetics* 37, 198-204.

Corti, O., Lesage, S., Brice, A., 2011. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological reviews* 91, 1161-1218.

Corti, O., Hampe, C., Koutnikova, H., Darios, F., Jacquier, S., Prigent, A., Robinson, J.C., Pradier, L., Ruberg, M., Mirande, M., Hirsch, E., Rooney, T., Fournier, A., Brice, A., 2003. The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Human molecular genetics* 12, 1427-1437.

Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N., 1992. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15;89(16):7370-4

Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., Lim, D., Malorni, W., Davies, K.J., Carafoli, E., Scorrano, L., 2010. Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO molecular medicine* 2, 490-503.

Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S., Gellene, R., 1969. L-dopa in parkinson's syndrome. *The New England journal of medicine* 281, 272.

Cowan, C.M., Fan, M.M., Fan, J., Shehadeh, J., Zhang, L.Y., Graham, R.K., Hayden, M.R., Raymond, L.A., 2008. Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity. *J Neurosci* 28, 12725-12735.

Cowan, W.M., Powell, T.P., 1956. A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain* 79, 364-390.

Cudkowicz, M., Kowall, N.W., 1990. Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Annals of neurology* 27, 200-204.

Cui, L., Jeong, H., Brovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., Krainc, D., 2006. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59-69.

Cui, M., Tang, X., Christian, W.V., Yoon, Y., Tieu, K., 2010. Perturbations in mitochondrial dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial division inhibitor mdivi-1. *The Journal of biological chemistry* 285, 11740-11752.

Czlonkowska, A., Kohutnicka, M., Kurkowska-Jastrzebska, I., Czlonkowski, A., 1996. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegeneration* 5, 137-143.

D-

Dagda, R.K., Cherra, S.J., 3rd, Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D., Chu, C.T., 2009. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *The Journal of biological chemistry* 284, 13843-13855.

Dalfo, E., Barrachina, M., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Ferrer, I., 2004a. Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease. *Neurobiology of disease* 16, 92-97.

Dalfo, E., Gomez-Isla, T., Rosa, J.L., Nieto Bodelon, M., Cuadrado Tejedor, M., Barrachina, M., Ambrosio, S., Ferrer, I., 2004b. Abnormal alpha-synuclein interactions with Rab proteins in alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63, 302-313.

Dalrymple, A., Wild, E.J., Joubert, R., Sathasivam, K., Bjorkqvist, M., Petersen, A., Jackson, G.S., Isaacs, J.D., Kristiansen, M., Bates, G.P., Leavitt, B.R., Keir, G., Ward, M., Tabrizi, S.J., 2007. Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *Journal of proteome research* 6, 2833-2840.

Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N., Brouillet, E., 2010. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1802, 52-61.

Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., Manfredi, G., 2006. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Journal of neurochemistry* 96, 1349-1361.

Darios, F., Corti, O., Lucking, C.B., Hampe, C., Muriel, M.P., Abbas, N., Gu, W.J., Hirsch, E.C., Rooney, T., Ruberg, M., Brice, A., 2003. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Human molecular genetics* 12, 517-526.

Darnell, G., Orgel, J.P., Pahl, R., Meredith, S.C., 2007. Flanking polyproline sequences inhibit beta-sheet structure in polyglutamine segments by inducing PPII-like helix structure. *Journal of molecular biology* 374, 688-704.

Das, E., Jana, N.R., Bhattacharyya, N.P., 2013. MicroRNA-124 targets CCNA2 and regulates cell cycle in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells. *Biochemical and biophysical research communications* 437, 217-224.

Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.

- David, G., Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Abbas, N., Benomar, A., Belal, S., Lebre, A.S., Abada-Bendib, M., Grid, D., Holmberg, M., Yahyaoui, M., Hentati, F., Chkili, T., Agid, Y., Brice, A., 1998. Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Human molecular genetics* 7, 165-170.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., Bates, G.P., 1997. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2010. The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 25 Suppl 1, S32-39.
- Dawson, T.M., Ko, H.S., Dawson, V.L., 2010. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66, 646-661.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2003. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* 111, 145-151.
- de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P., Deglon, N., 2002. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22, 3473-3483.
- de la Monte, S.M., Vonsattel, J.P., Richardson, E.P., Jr., 1988. Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 47, 516-525.
- de Lau, L.M., Breteler, M.M., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology* 5, 525-535.
- de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., Rocca, W.A., 1997. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 62, 10-15.
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Desmond, H., Kjaer, S., Loh, S.H., Renton, A.E., Harvey, R.J., Whitworth, A.J., Martins, L.M., Abramov, A.Y., Wood, N.W., 2011. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Human molecular genetics* 20, 867-879.
- Deglon, N., Tseng, J.L., Bensadoun, J.C., Zurn, A.D., Arsenijevic, Y., Pereira de Almeida, L., Zufferey, R., Trono, D., Aebischer, P., 2000. Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Human gene therapy* 11, 179-190.
- Dehvari, N., Sandebring, A., Flores-Morales, A., Mateos, L., Chuan, Y.C., Goldberg, M.S., Cookson, M.R., Cowburn, R.F., Cedazo-Minguez, A., 2008. Parkin-mediated ubiquitination regulates phospholipase C-gamma1. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 3061-3068.

Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C., Schiavo, G., 2006. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52, 293-305.

del Toro, D., Alberch, J., Lazaro-Dieguez, F., Martin-Ibanez, R., Xifro, X., Egea, G., Canals, J.M., 2009. Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Molecular biology of the cell* 20, 1478-1492.

Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., Hamel, C.P., 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human genetics* 109, 584-591.

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., Hamel, C.P., 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature genetics* 26, 207-210.

DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* 13, 281-285.

den Jager, W.A., 1969. Sphingomyelin in Lewy inclusion bodies in Parkinson's disease. *Archives of neurology* 21, 615-619.

Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H., Guo, M., 2008. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14503-14508.

Deng, Y.P., Albin, R.L., Penney, J.B., Young, A.B., Anderson, K.D., Reiner, A., 2004. Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of chemical neuroanatomy* 27, 143-164.

Deshaiés, R.J., Joazeiro, C.A., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 78, 399-434.

Desmond, C.R., Atwal, R.S., Xia, J., Truant, R., 2012. Identification of a karyopherin beta1/beta2 proline-tyrosine nuclear localization signal in huntingtin protein. *The Journal of biological chemistry* 287, 39626-39633.

Desplats, P., Lee, H.J., Bae, E.J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., Lee, S.J., 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13010-13015.

Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., Anandatheerthavarada, H.K., 2008. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of biological chemistry* 283, 9089-9100.

Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., Marsden, C.D., 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 52, 381-389.

Dheen, S.T., Kaur, C., Ling, E.A., 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current medicinal chemistry* 14, 1189-1197.

Di Fonzo, A., Dekker, M.C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E.H., Correia Guedes, L., Szczerbinska, A., Zhao, T., Dubbel-Hulsman, L.O., Wouters, C.H., de Graaff, E., Oyen, W.J., Simons, E.J., Breedveld, G.J., Oostra, B.A., Horstink, M.W., Bonifati, V., 2009. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72, 240-245.

DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., Manoharan, M., Sah, D.W., Zamore, P.D., Aronin, N., 2007. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17204-17209.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., Aronin, N., 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, N.Y)* 277, 1990-1993.

DiFiglia, M., Pasik, P., Pasik, T., 1976. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain research* 114, 245-256.

Diguet, E., Petit, F., Escartin, C., Cambon, K., Bizat, N., Dufour, N., Hantraye, P., Deglon, N., Brouillet, E., 2009. Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PloS one* 4, e4637.

Ding, W.X., Ni, H.M., Li, M., Liao, Y., Chen, X., Stolz, D.B., Dorn, G.W., 2nd, Yin, X.M., 2010. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *The Journal of biological chemistry* 285, 27879-27890.

Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P., 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11908-11913.

Djaldetti, R., Shifrin, A., Rogowski, Z., Sprecher, E., Melamed, E., Yarnitsky, D., 2004. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. *Neurology* 62, 2171-2175.

Djousse, L., Knowlton, B., Cupples, L.A., Marder, K., Shoulson, I., Myers, R.H., 2002. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* 59, 1325-1330.

Dohm, C.P., Kermer, P., Bahr, M., 2008. Aggregopathy in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implication. *Neuro-degenerative diseases* 5, 321-338.

Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelieres, F.P., King, S.J., Humbert, S., Saudou, F., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27, 3571-3583.

Dragatsis, I., Efstratiadis, A., Zeitlin, S., 1998. Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development (Cambridge, England)* 125, 1529-1539.

Drew, B., Leeuwenburgh, C., 2002. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 959, 66-81.

Dufour, C.R., Wilson, B.J., Huss, J.M., Kelly, D.P., Alaynick, W.A., Downes, M., Evans, R.M., Blanchette, M., Giguere, V., 2007. Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERR α and γ . *Cell metabolism* 5, 345-356.

Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., Krainc, D., 2002. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science (New York, N.Y.)* 296, 2238-2243.

Dutta, R., Trapp, B.D., 2011. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology* 93, 1-12.

Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagener, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E.I., Imhof, A., Neupert, W., Langer, T., Reichert, A.S., 2007. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Molecular biology of the cell* 18, 3582-3590.

Dye, B.T., Schulman, B.A., 2007. Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36, 131-150.

E-

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N., 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280.

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, M.C., Gage, F.H., Yamanaka, S., Inoue, H., 2012. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science translational medicine* 4, 145ra104.

Eichner, L.J., Giguere, V., 2011. Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. *Mitochondrion* 11, 544-552.

Ekholm-Reed, S., Goldberg, M.S., Schlossmacher, M.G., Reed, S.I., 2013. Parkin-dependent degradation of the F-box protein Fbw7 β promotes neuronal survival in response to oxidative stress by stabilizing Mcl-1. *Molecular and cellular biology* 33, 3627-3643.

Ekstrand, M.I., Terzioglu, M., Galter, D., Zhu, S., Hofstetter, C., Lindqvist, E., Thams, S., Bergstrand, A., Hansson, F.S., Trifunovic, A., Hoffer, B., Cullheim, S., Mohammed, A.H., Olson,

L., Larsson, N.G., 2007. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1325-1330.

Ellrichmann, G., Petrasch-Parwez, E., Lee, D.H., Reick, C., Arning, L., Saft, C., Gold, R., Linker, R.A., 2011. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. *PLoS one* 6, e16172.

Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., Saada, A., 2005. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *American journal of human genetics* 76, 1081-1086.

Engelender, S., Sharp, A.H., Colomer, V., Tokito, M.K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E.L., Ross, C.A., 1997. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Human molecular genetics* 6, 2205-2212.

Exner, N., Lutz, A.K., Haass, C., Winklhofer, K.F., 2012. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal* 31, 3038-3062.

Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmstrom, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.H., Gasser, T., Kruger, R., Winklhofer, K.F., Vogel, F., Reichert, A.S., Auburger, G., Kahle, P.J., Schmid, B., Haass, C., 2007. Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27, 12413-12418.

F-

Faber, P.W., Voisine, C., King, D.C., Bates, E.A., Hart, A.C., 2002. Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 17131-17136.

Faideau, M., Kim, J., Cormier, K., Gilmore, R., Welch, M., Auregan, G., Dufour, N., Guillemier, M., Brouillet, E., Hantraye, P., Deglon, N., Ferrante, R.J., Bonvento, G., 2010. In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet* 19:3053-3067.

Fallon, L., Moreau, F., Croft, B.G., Labib, N., Gu, W.J., Fon, E.A., 2002. Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *The Journal of biological chemistry* 277, 486-491.

Falush, D., Almquist, E.W., Brinkmann, R.R., Iwasa, Y., Hayden, M.R., 2001. Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *American journal of human genetics* 68, 373-385.

Faull, R.L., Waldvogel, H.J., Nicholson, L.F., Synek, B.J., 1993. The distribution of GABA_A-benzodiazepine receptors in the basal ganglia in Huntington's disease and in the quinolinic acid-lesioned rat. *Progress in brain research* 99, 105-123.

- Feany, M.B., Bender, W.W., 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394-398.
- Fearnley, J.M., Lees, A.J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5), 2283-2301.
- Feigin, A., Leenders, K.L., Moeller, J.R., Missimer, J., Kuenig, G., Spetsieris, P., Antonini, A., Eidelberg, D., 2001. Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18)F]FDG PET study. *J Nucl Med* 42, 1591-1595.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., Deshaies, R.J., 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-230.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Cipolloni, P.B., Storey, E., Beal, M.F., 1993. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Experimental neurology* 119, 46-71.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Richardson, E.P., Jr., 1991. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci* 11, 3877-3887.
- Ferrante, R.J., Beal, M.F., Kowall, N.W., Richardson, E.P., Jr., Martin, J.B., 1987. Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain research* 411, 162-166.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., Richardson, E.P., Jr., Bird, E.D., Martin, J.B., 1985. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y)* 230, 561-563.
- Ferre, S., Fredholm, B.B., Morelli, M., Popoli, P., Fuxe, K., 1997. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in neurosciences* 20, 482-487.
- Fett, M.E., Pils, A., Paquet, D., van Bebber, F., Haass, C., Tatzelt, J., Schmid, B., Winklhofer, K.F., 2010. Parkin is protective against proteotoxic stress in a transgenic zebrafish model. *PLoS one* 5, e11783.
- Flinn, L., Mortiboys, H., Volkmann, K., Koster, R.W., Ingham, P.W., Bandmann, O., 2009. Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain* 132, 1613-1623.
- Ford, B., Louis, E.D., Greene, P., Fahn, S., 1996. Oral and genital pain syndromes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 11, 421-426.
- Fornai, F., Longone, P., Cafaro, L., Kastsuchenka, O., Ferrucci, M., Manca, M.L., Lazzeri, G., Spalloni, A., Bellio, N., Lenzi, P., Modugno, N., Siciliano, G., Isidoro, C., Murri, L., Ruggieri, S., Paparelli, A., 2008. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2052-2057.
- Forno, L.S., 1987. The Lewy body in Parkinson's disease. *Advances in neurology* 45, 35-43.

Förster T (1948) *Ann Phys* 2(1-2):55–75

Fournier, M., Vitte, J., Garrigue, J., Langui, D., Dullin, J.P., Saurini, F., Hanoun, N., Perez-Diaz, F., Cornilleau, F., Joubert, C., Ardila-Osorio, H., Traver, S., Duchateau, R., Goujet-Zalc, C., Paleologou, K., Lashuel, H.A., Haass, C., Duyckaerts, C., Cohen-Salmon, C., Kahle, P.J., Hamon, M., Brice, A., Corti, O., 2009. Parkin deficiency delays motor decline and disease manifestation in a mouse model of synucleinopathy. *PLoS one* 4, e6629.

Franich, N.R., Fitzsimons, H.L., Fong, D.M., Klugmann, M., During, M.J., Young, D., 2008. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther* 16, 947-956.

Fransson, S., Ruusala, A., Aspenstrom, P., 2006. The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochemical and biophysical research communications* 344, 500-510.

Frazier, A.E., Thorburn, D.R., 2012. Biochemical analyses of the electron transport chain complexes by spectrophotometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 837, 49-62).

Fried, H., Kutay, U., 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60, 1659-1688.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., Voeltz, G.K., 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* (New York, N.Y 334, 358-362).

Frohlich, C., Grabiger, S., Schwefel, D., Faelber, K., Rosenbaum, E., Mears, J., Rocks, O., Daumke, O., 2013. Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *The EMBO journal* 32, 1280-1292.

Fronczek, R., Overeem, S., Lee, S.Y., Hegeman, I.M., van Pelt, J., van Duinen, S.G., Lammers, G.J., Swaab, D.F., 2007. Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease. *Brain* 130, 1577-1585.

Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J., Holden, J.J., Fenwick, R.G., Jr., Warren, S.T., et al., 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047-1058.

Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., Semenza, G.L., 2007. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, Apr 6;129(1):111-22.

G-

Gafni, J., Ellerby, L.M., 2002. Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* 22, 4842-4849.

Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Ellerby, L.M., 2004. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 279, 20211-20220.

Gai, W.P., Blessing, W.W., Blumbergs, P.C., 1995. Ubiquitin-positive degenerating neurites in the brainstem in Parkinson's disease. *Brain* 118 (Pt 6), 1447-1459.

Galpern, W.R., Lang, A.E., 2006. Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Annals of neurology* 59, 449-458.

Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, H., Deas, E., Klupsch, K., Downward, J., Latchman, D.S., Tabrizi, S.J., Wood, N.W., Duchen, M.R., Abramov, A.Y., 2009. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Molecular cell* 33, 627-638.

Gardoni, F., Schrama, L.H., Kamal, A., Gispen, W.H., Cattabeni, F., Di Luca, M., 2001. Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 21, 1501-1509.

Garrett, M.C., Soares-da-Silva, P., 1992. Increased cerebrospinal fluid dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid levels in Huntington's disease: evidence for an overactive dopaminergic brain transmission. *Journal of neurochemistry* 58, 101-106.

Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., Saudou, F., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.

Gautier, C.A., Kitada, T., Shen, J., 2008. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11364-11369.

Geddes, J.W., 2005. alpha-Synuclein: a potent inducer of tau pathology. *Experimental neurology* 192, 244-250.

Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.Y., Rojo, M., Schapira, A.H., Taanman, J.W., 2010. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human molecular genetics* 19, 4861-4870.

Geisler, S., Holmstrom, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., Springer, W., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* 12, 119-131.

Gelb, D.J., Oliver, E., Gilman, S., 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of neurology* 56, 33-39.

Georgopoulos M. D. a. A., (1981). Motor function of the basal ganglia. *In* "Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System", pp. 1017-1061, American physiological Society, Bethesda, Maryland.

Gerfen, C.R., Engber, T.M., 1992. Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach. *Neurologic clinics* 10, 435-449.

Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr., Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y)* 250, 1429-1432.

Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., Rasper, D.M., Roy, S., Hayden, M.R., Nicholson, D.W., 2002. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. *Nature cell biology* 4, 95-105.

Ghafourifar, P., Richter, C., 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS letters* 418, 291-296.

Ghasemzadeh, M.B., Sharma, S., Surmeier, D.J., Eberwine, J.H., Chesselet, M.F., 1996. Multiplicity of glutamate receptor subunits in single striatal neurons: an RNA amplification study. *Molecular pharmacology* 49, 852-859.

Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmuller, H., D'Adamo, P., Gasparini, P., Strom, T.M., Prokisch, H., Invernizzi, F., Ferrero, I., Zeviani, M., 2009. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nature genetics* 41, 654-656.

Giaime, E., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S., Robert, G., Grosso, S., Auburger, P., Goldberg, M.S., Shen, J., Heutink, P., Pouyssegur, J., Pages, G., Checler, F., Alves da Costa, C., 2010. Loss of function of DJ-1 triggered by Parkinson's disease-associated mutation is due to proteolytic resistance to caspase-6. *Cell death and differentiation* 17, 158-169.

Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science (New York, N.Y)* 290, 985-989.

Giasson, B.I., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2003. Interactions of amyloidogenic proteins. *Neuromolecular medicine* 4, 49-58.

Gibb, W.R., Lees, A.J., 1991. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 54, 388-396.

Gibb, W.R., Lees, A.J., 1989. The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathology and applied neurobiology* 15, 27-44.

Gines, S., Seong, I.S., Fossale, E., Ivanova, E., Trettel, F., Gusella, J.F., Wheeler, V.C., Persichetti, F., MacDonald, M.E., 2003. Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Human molecular genetics* 12, 497-508.

Ginovart, N., Lundin, A., Farde, L., Halldin, C., Backman, L., Swahn, C.G., Pauli, S., Sedvall, G., 1997. PET study of the pre- and post-synaptic dopaminergic markers for the neurodegenerative process in Huntington's disease. *Brain* 120 (Pt 3), 503-514.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G., Bernardi, P., 2013. Dimers of mitochondrial ATP

synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 5887-5892.

Giovannoni, G., van Schalkwyk, J., Fritz, V.U., Lees, A.J., 1999. Bradykinesia akinesia incoordination test (BRAIN TEST): an objective computerised assessment of upper limb motor function. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 67, 624-629.

Girard, M., Lariviere, R., Parfitt, D.A., Deane, E.C., Gaudet, R., Nossova, N., Blondeau, F., Prenosil, G., Vermeulen, E.G., Duchon, M.R., Richter, A., Shoubridge, E.A., Gehring, K., McKinney, R.A., Brais, B., Chapple, J.P., McPherson, P.S., 2012. Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1661-1666.

Gispert, S., Ricciardi, F., Kurz, A., Azizov, M., Hoepken, H.H., Becker, D., Voos, W., Leuner, K., Muller, W.E., Kudin, A.P., Kunz, W.S., Zimmermann, A., Roeper, J., Wenzel, D., Jendrach, M., Garcia-Arencibia, M., Fernandez-Ruiz, J., Huber, L., Rohrer, H., Barrera, M., Reichert, A.S., Rub, U., Chen, A., Nussbaum, R.L., Auburger, G., 2009. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PloS one* 4, e5777.

Gitler, A.D., Chesi, A., Geddie, M.L., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Hill, K.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Cooper, A.A., Rochet, J.C., Lindquist, S., 2009. Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nature genetics* 41, 308-315.

Giulivi, C., 2007. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Foundation symposium* 287, 92-100; discussion 100-104.

Giulivi, C., 1998. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *The Biochemical journal* 332 (Pt 3), 673-679.

Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L., 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505-519.

Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., Schwarz, T.L., 2006. Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *The Journal of cell biology* 173, 545-557.

Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K., Moore, D.J., 2011. Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *Journal of neurochemistry* 118, 636-645.

Gluck, M.R., Zeevalk, G.D., 2004. Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases. *Journal of neurochemistry* 91, 788-795.

Godin, J., Humbert, S., 2011. Huntingtin, mitosis and cell fate. *Med Sci (Paris)* 27, 126-128.

Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., Humbert, S., 2010. Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392-406.

Goebel, D.J., Poosch, M.S., 1999. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69, 164-170.

Goedert M., Spillantini M.G., Del Tredici K., Braak H., 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology* 9, 13-24.

Goldberg, M.S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T.A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tschertter, A., Martins, A., Bernardi, G., Roth, B.L., Pothos, E.N., Calabresi, P., Shen, J., 2005. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 45, 489-496.

Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., Cepeda, C., Lam, H.A., Bhatnagar, A., Meloni, E.G., Wu, N., Ackerson, L.C., Klapstein, G.J., Gajendiran, M., Roth, B.L., Chesselet, M.F., Maidment, N.T., Levine, M.S., Shen, J., 2003. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry* 278, 43628-43635.

Gomes, L.C., Di Benedetto, G, and Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* 2011 May;13(5):589-98.

Gonitel, R., Moffitt, H., Sathasivam, K., Woodman, B., Detloff, P.J., Faull, R.L., Bates, G.P., 2008. DNA instability in postmitotic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3467-3472.

Gottlieb E., Ian P. M. Tomlinson I.P.M., 2005. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nature Reviews Cancer* 5 (11), 857-866.

Graham, R.K., Deng, Y., Carroll, J., Vaid, K., Cowan, C., Pouladi, M.A., Metzler, M., Bissada, N., Wang, L., Faull, R.L., Gray, M., Yang, X.W., Raymond, L.A., Hayden, M.R., 2010. Cleavage at the 586 amino acid caspase-6 site in mutant huntingtin influences caspase-6 activation in vivo. *J Neurosci* 30, 15019-15029.

Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., Warby, S.C., Doty, C.N., Roy, S., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Raymond, L.A., Nicholson, D.W., Hayden, M.R., 2006. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179-1191.

Graveland, G.A., Williams, R.S., DiFiglia, M., 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y)* 227, 770-773.

Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.H., Sun, Y.E., Li, X.J., Levine, M.S., Yang, X.W., 2008. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* 28, 6182-6195.

Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., Kimura, M., 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science (New York, N.Y)* 265, 1826-1831.

Graybiel, A.M., Ragsdale, C.W., Jr., 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 5723-5726.

Greenamyre, J.T., Betarbet, R., Sherer, T.B., 2003. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism & related disorders* 9 Suppl 2, S59-64.

Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon EA 2012. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep*; 13:378-85.

Greene, J.C., Whitworth, A.J., Kuo, I., Andrews, L.A., Feany, M.B., Pallanck, L.J., 2003. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4078-4083.

Greene, J.G., Greenamyre, J.T., 1996. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in neurobiology* 48, 613-634.

Greene, J.G., Greenamyre, J.T., 1995. Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *Journal of neurochemistry* 64, 2332-2338.

Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A.M., Nie, E.H., Makani, S., Tian, N., Castillo, P.E., Buchman, V.L., Chandra, S.S., 2010. α -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19573-19578.

Griparic, L., Kanazawa, T., van der Blik, A.M., 2007. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *The Journal of cell biology* 178, 757-764.

Grivennikova, V.G., Kareyeva, A.V., Vinogradov, A.D., 2010. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? *Biochimica et biophysica acta* 1797, 939-944.

Grohm J., Kim S.W., Mamrak U., Tobaben S., Cassidy-Stone A., Nunnari J., Plesnila N., Culmsee C., 2012. Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death and Differentiation* 19, 1446-1458

Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of neurology* 39, 385-389.

Gu, X., Greiner, E.R., Mishra, R., Kodali, R., Osmand, A., Finkbeiner, S., Steffan, J.S., Thompson, L.M., Wetzel, R., Yang, X.W., 2009. Serines 13 and 16 are critical determinants of full-length human mutant huntingtin induced disease pathogenesis in HD mice. *Neuron* 64, 828-840.

Guidetti, P., Charles, V., Chen, E.Y., Reddy, P.H., Kordower, J.H., Whetsell, W.O., Jr., Schwarcz, R., Tagle, D.A., 2001. Early degenerative changes in transgenic mice expressing

mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Experimental neurology* 169, 340-350.

Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., Zinsmaier, K.E., 2005. The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* 47, 379-393.

Gusella, J.F., MacDonald, M.E., 2000. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 1, 109-115.

Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., et al., 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238.

Gutkunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Mulroy, J.S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R.J., Hersch, S.M., Li, X.J., 1999. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19, 2522-2534.

Gutkunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., Hersch, S.M., 1995. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8710-8714.

H-

Haas, R.H., Nasirian, F., Nakano, K., Ward, D., Pay, M., Hill, R., Shults, C.W., 1995. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Annals of neurology* 37, 714-722.

Hagglund, J., Aquilonius, S.M., Eckernas, S.A., Hartvig, P., Lundquist, H., Gullberg, P., Langstrom, B., 1987. Dopamine receptor properties in Parkinson's disease and Huntington's chorea evaluated by positron emission tomography using ¹¹C-N-methyl-spiperone. *Acta neurologica Scandinavica* 75, 87-94.

Hales, K.G., Fuller, M.T., 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.

Hallett, P.J., Dunah, A.W., Ravenscroft, P., Zhou, S., Bezard, E., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., Standaert, D.G., 2005. Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 48, 503-516.

Halliday, G., Baker, K., Harper, C., 1995. Serotonin and alcohol-related brain damage. *Metabolic brain disease* 10, 25-30.

Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., Matsushita, M., 2008. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *The Journal of cell biology* 182, 573-585.

Handschin C., Kobayashi Y.M., Chin S., Seale P., Campbell K.P., Spiegelman B.M., 2007. PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne Muscular Dystrophy. *Genes Dev.* Apr 1, 2007; 21(7): 770–783.

Handschin, C., Spiegelman, B.M., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine reviews* 27, 728-735.

Hantraye, P., Riche, D., Maziere, M., Isacson, O., 1990. A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Experimental neurology* 108, 91-104.

Hao, H.X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephoure, N., Bayley, J.P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C.W., Schiffman, J.D., Bentz, B.G., Gygi, S.P., Winge, D.R., Kremer, H., Rutter, J., 2009. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science (New York, N.Y.)* 325, 1139-1142.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.

Harrington, A.J., Hamamichi, S., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., 2010. *C. elegans* as a model organism to investigate molecular pathways involved with Parkinson's disease. *Dev Dyn* 239, 1282-1295.

Hatano, T., Kubo, S., Imai, S., Maeda, M., Ishikawa, K., Mizuno, Y., Hattori, N., 2007. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Human molecular genetics* 16, 678-690.

Hattori, N., Tanaka, M., Ozawa, T., Mizuno, Y., 1991. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 30, 563-571.

Havel, L.S., Wang, C.E., Wade, B., Huang, B., Li, S., Li, X.J., 2011. Preferential accumulation of N-terminal mutant huntingtin in the nuclei of striatal neurons is regulated by phosphorylation. *Human molecular genetics* 20, 1424-1437.

Hayden, M.R., Martin, W.R., Stoessl, A.J., Clark, C., Hollenberg, S., Adam, M.J., Ammann, W., Harrop, R., Rogers, J., Ruth, T., et al., 1986. Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 36, 888-894.

He, F., Zhang, S., Qian, F., Zhang, C., 1995. Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology* 45, 2178-2183.

Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S., Ferreira, J.J., Tolosa, E., Kay, D.M., Klein, C., Williams, D.R., Marras, C., Lang, A.E., Wszolek, Z.K., Berciano, J., Schapira, A.H., Lynch, T., Bhatia, K.P., Gasser, T., Lees, A.J., Wood, N.W., 2008a. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet neurology* 7, 583-590.

Healy, D.G., Wood, N.W., Schapira, A.H., 2008b. Test for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease. *Practical neurology* 8, 381-385.

Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Casas, J.P., Ahmadi, K.R., Lynch, T., Gandhi, S., Muqit, M.M., Foltynie, T., Barker, R., Bhatia, K.P., Quinn, N.P., Lees, A.J., Gibson, J.M., Holton, J.L., Revesz, T., Goldstein, D.B., Wood, N.W., 2006. UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. *Annals of neurology* 59, 627-633.

Hedreen, J.C., Folstein, S.E., 1995. Early loss of neostriatal striosome neurons in Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 54, 105-120.

Hedreen, J.C., Peyser, C.E., Folstein, S.E., Ross, C.A., 1991. Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neuroscience letters* 133, 257-261.

Heinsen, H., Strik, M., Bauer, M., Luther, K., Ulmar, G., Gangnus, D., Jungkunz, G., Eisenmenger, W., Gotz, M., 1994. Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta neuropathologica* 88, 320-333.

Helling, S., Vogt, S., Rhiel, A., Ramzan, R., Wen, L., Marcus, K., Kadenbach, B., 2008. Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Mol Cell Proteomics* 7, 1714-1724.

Hely, M.A., Morris, J.G., Reid, W.G., Trafficante, R., 2005. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* 20, 190-199.

Henn, I.H., Bouman, L., Schlehe, J.S., Schlierf, A., Schramm, J.E., Wegener, E., Nakaso, K., Culmsee, C., Berninger, B., Krappmann, D., Tatzelt, J., Winklhofer, K.F., 2007. Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ B kinase/nuclear factor- κ B signaling. *J Neurosci* 27, 1868-1878.

Herkenham, M., Pert, C.B., 1981. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291, 415-418.

Hermann, G.J., Shaw, J.M., 1998. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 265-303.

Hermel E., Gafni, J., Prop, S.S., Leavitt B.R., Wellington C.L., Young J.E., Hackam A.S., Logvinova A.V., Peel A.L., Chen S.F., Hook V., Singaraja R., Krajewski S., Goldsmith P.C., Ellerby H.M., Hayden M.R., Bredesen D.E., Ellerby L.M., 2004. Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell death and differentiation* 11, 424-438.

Hersch S.M., Gevorkian S., Marder K, Moskowitz C, Feigin A, Cox M, Como P, Zimmerman C, Lin M, Zhang L, Ulug AM, Beal MF, Matson W, Bogdanov M, Ebbel E, Zaleta A, Kaneko Y, Jenkins B, Hevelone N, Zhang H, Yu H, Schoenfeld D, Ferrante R, Rosas HD, 2006. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH²dG. *Neurology*, 66:250–2.

Hidalgo, C., 2005. Cross talk between Ca²⁺ and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca²⁺ release channels. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 360, 2237-2246.

Hidalgo, C., Donoso, P., Carrasco, M.A., 2005. The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? *IUBMB life* 57, 315-322.

Hietakangas, V., Cohen, S.M., 2008. TORCing up metabolic control in the brain. *Cell metabolism* 7, 357-358.

Hirsch, E.C., Hunot, S., Hartmann, A., 2005. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 11 Suppl 1, S9-S15.

Hirsch, E.C., Graybiel, A.M., Duyckaerts, C., Javoy-Agid, F., 1987. Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5976-5980.

Hockly, E., Richon, V.M., Woodman, B., Smith, D.L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P.A., Steffan, J.S., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lewis, C.M., Marks, P.A., Bates, G.P., 2003. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2041-2046.

Holbert, S., Denghien, I., Kiechle, T., Rosenblatt, A., Wellington, C., Hayden, M.R., Margolis, R.L., Ross, C.A., Dausset, J., Ferrante, R.J., Neri, C., 2001. The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1811-1816.

Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M., 2005. The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science* 118, 5411-5419.

Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* 17, 31-108.

Hong, J.H., Kim, M.J., Park, M.R., Kwag, O.G., Lee, I.S., Byun, B.H., Lee, S.C., Lee, K.B., Rhee, S.J., 2004. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 340, 107-115.

Hoppins, S., Lackner, L., Nunnari, J., 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76, 751-780.

Hornykiewicz, O., 2006. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*, 9-15.

Hornykiewicz, O., 1988. Neurochemical pathology and the etiology of Parkinson's disease: basic facts and hypothetical possibilities. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 55, 11-20.

Houlden, H., Singleton, A.B., 2012. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 124, 325-338.

Huang, H., Frohman, M.A., 2009. Lipid signaling on the mitochondrial surface. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 839-844.

Hulbert, A.J., 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of theoretical biology* 234, 277-288.

Hunker, C.J., Abbs, J.H., Barlow, S.M., 1982. The relationship between parkinsonian rigidity and hypokinesia in the orofacial system: a quantitative analysis. *Neurology* 32, 749-754.

Huntington Consortium DiPSC, 2012. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell stem cell* 11, 264-278.

Huntington Group, S.G., 2006. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology* 66, 366-372.

Huntington Group, T.H.s.D.C.R., 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.

Huttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., Doan, J.W., 2007. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1701-1720.

Huynh, D.P., Scoles, D.R., Nguyen, D., Pulst, S.M., 2003. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Human molecular genetics* 12, 2587-2597.

Hyun, D.H., Lee, M., Halliwell, B., Jenner, P., 2005. Effect of overexpression of wild-type or mutant parkin on the cellular response induced by toxic insults. *Journal of neuroscience research* 82, 232-244.

Hyun, T.S., Li, L., Oravec-Wilson, K.I., Bradley, S.V., Provot, M.M., Munaco, A.J., Mizukami, I.F., Sun, H., Ross, T.S., 2004. Hip1-related mutant mice grow and develop normally but have accelerated spinal abnormalities and dwarfism in the absence of HIP1. *Molecular and cellular biology* 24, 4329-4340.

I-

Ichas, F., Mazat, J.P., 1998. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica et biophysica acta* 1366, 33-50.

Ilieva, H., Polymenidou, M., Cleveland, D.W., 2009. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of cell biology* 187, 761-772.

Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E., Lu, B., 2008. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *The EMBO journal* 27, 2432-2443.

Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I., Takahashi, R., 2002. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Molecular cell* 10, 55-67.

Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Takahashi, R., 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105, 891-902.

Imai, Y., Soda, M., Takahashi, R., 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 275, 35661-35664.

Imam, S.Z., Zhou, Q., Yamamoto, A., Valente, A.J., Ali, S.F., Bains, M., Roberts, J.L., Kahle, P.J., Clark, R.A., Li, S., 2011. Novel regulation of parkin function through c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 31, 157-163.

Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., Hashizume, Y., 2003. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta neuropathologica* 106, 518-526.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., Mihara, K., 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal* 25, 2966-2977.

Itier, J.M., Ibanez, P., Mena, M.A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G.A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., Ret, G., Joubert, C., Periquet, M., Araujo, F., Negroni, J., Casarejos, M.J., Canals, S., Solano, R., Serrano, A., Gallego, E., Sanchez, M., Deneffe, P., Benavides, J., Tremp, G., Rooney, T.A., Brice, A., Garcia de Yebenes, J., 2003. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human molecular genetics* 12, 2277-2291.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13, 76-86.

Ivanov, V.N., Ronai, Z., 2000. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene* 19, 3003-3012.

J-

Jackson, G.R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P.W., MacDonald, M.E., Zipursky, S.L., 1998. Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* 21, 633-642.

Jacob, T.C., Moss, S.J., Jurd, R., 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9, 331-343.

Jacobsen, J.C., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan, C.J., Reid, S.J., Waldvogel, H.J., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Walker, S.K., Kelly, J.M., Webb, G.C., Faull, R.L., Rees, M.I., Snell, R.G., 2010. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human molecular genetics* 19, 1873-1882.

Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79, 368-376.

- Jaquet, V., Bedard, K., 2009. Editorial: Genetic mapping--the path of discovery for novel functions of the NOX NADPH oxidases. *Journal of leukocyte biology* 86, 461-463.
- Jellinger, K.A., 2012. Interaction between pathogenic proteins in neurodegenerative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine* 16, 1166-1183.
- Jellinger, K.A., 2010. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 457-487.
- Jellinger, K.A., 1988. The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51, 540-543.
- Jellinger, K.A., 1987. Overview of morphological changes in Parkinson's disease. *Advances in neurology* 45, 1-18.
- Jenkins, B.G., Koroshetz, W.J., Beal, M.F., Rosen, B.R., 1993. Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy. *Neurology* 43, 2689-2695.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.
- Jenner, P., Taquet, H., Mauborgne, A., Benoliel, J.T., Cesselin, F., Rose, S., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Marsden, C.D., 1986. Lack of change in basal ganglia neuropeptide content following subacute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment of the common marmoset. *Journal of neurochemistry* 47, 1548-1551.
- Jiang, H., Jiang, Q., Feng, J., 2004. Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *The Journal of biological chemistry* 279, 54380-54386.
- Jiang, Q., Ren, Y., Feng, J., 2008. Direct binding with histone deacetylase 6 mediates the reversible recruitment of parkin to the centrosome. *J Neurosci* 28, 12993-13002.
- Jin SM, Youle RJ, 2013. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy*. Nov 1;9(11):1750-7.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., Youle, R.J., 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of cell biology* 191, 933-942.
- Jin, Y.N., Yu, Y.V., Gundemir, S., Jo, C., Cui, M., Tieu, K., Johnson, G.V., 2013. Impaired mitochondrial dynamics and Nrf2 signaling contribute to compromised responses to oxidative stress in striatal cells expressing full-length mutant huntingtin. *PLoS one* 8, e57932.
- Joch, M., Ase, A.R., Chen, C.X., MacDonald, P.A., Kontogianna, M., Corera, A.T., Brice, A., Seguela, P., Fon, E.A., 2007. Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels. *Molecular biology of the cell* 18, 3105-3118.

Johnson, B.N., Berger, A.K., Cortese, G.P., Lavoie, M.J., 2012. The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6283-6288.

Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R., 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of cell biology* 143, 1883-1898.

Johri A., Chandra A., Beal M.F., 2013. PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic Biol Med.* Sep;62:37-46. Epub 2013 Apr 19.

Johri A, Calingasan NY, Hennessey TM, Sharma A, Yang L, Wille E, Chandra A, Beal MF., 2012. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* Mar 1;21(5):1124-37. Epub 2011 Nov 17.

Jovicic, A., Zaldivar Jolissaint, J.F., Moser, R., Silva Santos Mde, F., Luthi-Carter, R., 2013. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms. *PloS one* 8, e54222.

Jucker, M., Walker, L.C., 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45-51.

K-

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19, 5720-5728.

Kafri, T., 2004. Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J) 246, 367-390.

Kahle, P.J., Waak, J., Gasser, T., 2009. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free radical biology & medicine* 47, 1354-1361.

Kalia, S.K., Lee, S., Smith, P.D., Liu, L., Crocker, S.J., Thorarinsdottir, T.E., Glover, J.R., Fon, E.A., Park, D.S., Lozano, A.M., 2004. BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron* 44, 931-945.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., Tang, D., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* 18, 571-580.

Karachi, C., Grabli, D., Bernard, F.A., Tande, D., Wattiez, N., Belaid, H., Bardinet, E., Prigent, A., Nothacker, H.P., Hunot, S., Hartmann, A., Lehericy, S., Hirsch, E.C., Francois, C., 2010. Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* 120, 2745-2754.

Karbowski, M., Jeong, S.Y., Youle, R.J., 2004. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *The Journal of cell biology* 166, 1027-1039.

Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., Youle, R.J., 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *The Journal of cell biology* 159, 931-938.

Karpinar, D.P., Baliya, M.B., Kugler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H., Kumar, A., Riedel, D., Fichtner, L., Voigt, A., Braus, G.H., Giller, K., Becker, S., Herzig, A., Baldus, M., Jackle, H., Eimer, S., Schulz, J.B., Griesinger, C., Zweckstetter, M., 2009. Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO journal* 28, 3256-3268.

Karpuj, M.V., Becher, M.W., Springer, J.E., Chabas, D., Youssef, S., Pedotti, R., Mitchell, D., Steinman, L., 2002a. Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nature medicine* 8, 143-149.

Karpuj, M.V., Becher, M.W., Steinman, L., 2002b. Evidence for a role for transglutaminase in Huntington's disease and the potential therapeutic implications. *Neurochemistry international* 40, 31-36.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C., 1990. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10, 3421-3438.

Kaye, J.A., Finkbeiner, S., 2013. Modeling Huntington's disease with induced pluripotent stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 56, 50-64.

Kazemi-Esfarjani, P., Benzer, S., 2000. Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y)* 287, 1837-1840.

Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., Bennett, J.P., Jr., 2006. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 26, 5256-5264.

Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.H., Chen, J.D., Nevins, J.R., Aronin, N., DiFiglia, M., 2002. Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *The Journal of biological chemistry* 277, 7466-7476.

Kelly, D.P., Scarpulla, R.C., 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18, 357-368.

Kempster, P.A., Hurwitz, B., Lees, A.J., 2007. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* 69, 482-485.

Kennedy, M.B., 1998. Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 243-257.

Kertesz, A., Martinez-Lage, P., Davidson, W., Munoz, D.G., 2000. The corticobasal degeneration syndrome overlaps progressive aphasia and frontotemporal dementia. *Neurology* 55, 1368-1375.

Killoran, A., Biglan, K.M., Jankovic, J., Eberly, S., Kayson, E., Oakes, D., Young, A.B., Shoulson, I., 2013. Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS. *Neurology* 80, 2022-2027.

Kim, I., Xu, W., Reed, J.C., 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7, 1013-1030.

Kim, J.M., Hong, S., Kim, G.P., Choi, Y.J., Kim, Y.K., Park, S.S., Kim, S.E., Jeon, B.S., 2007. Importance of low-range CAG expansion and CAA interruption in SCA2 Parkinsonism. *Archives of neurology* 64, 1510-1518.

Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z., Bezprozvanny, I., 2009. Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. *Structure* 17, 1205-1212.

Kim, R.H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G.C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L., Snow, B., Binari, R.C., Manoukian, A.S., Bray, M.R., Liu, F.F., Tsao, M.S., Mak, T.W., 2005a. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer cell* 7, 263-273.

Kim, R.H., Smith, P.D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M.P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A.J., Kalia, S.K., Horne, P., Westaway, D., Lozano, A.M., Anisman, H., Park, D.S., Mak, T.W., 2005b. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5215-5220.

Kim, V.N., 2005. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and cells* 19, 1-15.

Kim, Y., Zhou, P., Qian, L., Chuang, J.Z., Lee, J., Li, C., Iadecola, C., Nathan, C., Ding, A., 2007. MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival. *The Journal of experimental medicine* 204, 2063-2074.

Kim, Y.J., Park, H.J., Lee, G., Bang, O.Y., Ahn, Y.H., Joe, E., Kim, H.O., Lee, P.H., 2009. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia* 57, 13-23.

Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., DiFiglia, M., 2001. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12784-12789.

Kish, S.J., Shannak, K., Hornykiewicz, O., 1988. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England journal of medicine* 318, 876-880.

Kitada, T., Tong, Y., Gautier, C.A., Shen, J., 2009. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *Journal of neurochemistry* 111, 696-702.

Kitada, T., Pisani, A., Porter, D.R., Yamaguchi, H., Tscherter, A., Martella, G., Bonsi, P., Zhang, C., Pothos, E.N., Shen, J., 2007. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum

of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11441-11446.

Klein, C., Lohmann-Hedrich, K., 2007. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Current opinion in neurology* 20, 453-464.

Klein, C., Djarmati, A., Hedrich, K., Schafer, N., Scaglione, C., Marchese, R., Kock, N., Schule, B., Hiller, A., Lohnau, T., Winkler, S., Wiegers, K., Hering, R., Bauer, P., Riess, O., Abbruzzese, G., Martinelli, P., Pramstaller, P.P., 2005. PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet* 13, 1086-1093.

Knoblich, J.A., 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597.

Komander, D., Rape, M., 2012. The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* 81, 203-229.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.

Koopman, W.J., Verkaart, S., Visch, H.J., van der Westhuizen, F.H., Murphy, M.P., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., Willems, P.H., 2005. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth. *American journal of physiology* 288, C1440-1450.

Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., Olanow, C.W., 2008a. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature medicine* 14, 504-506.

Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Olanow, C.W., Freeman, T.B., 2008b. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov Disord* 23, 2303-2306.

Koroshetz, W.J., Jenkins, B.G., Rosen, B.R., Beal, M.F., 1997. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Annals of neurology* 41, 160-165.

Kortekaas, R., Leenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T., Hendrikse, N.H., 2005. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Annals of neurology* 57, 176-179.

Kowall, N.W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M.F., McKee, A.C., Ferrante, R.J., 2000. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 11, 211-213.

Kremer, H.P., Roos, R.A., Dingjan, G.M., Bots, G.T., Bruyn, G.W., Hofman, M.A., 1991. The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease. *Neuroscience letters* 132, 101-104.

Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19, 312-318.

Krige, D., Carroll, M.T., Cooper, J.M., Marsden, C.D., Schapira, A.H., 1992. Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Annals of neurology* 32, 782-788.

Kuhl, D.E., Phelps, M.E., Markham, C.H., Metter, E.J., Riege, W.H., Winter, J., 1982. Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Annals of neurology* 12, 425-434.

Kumar, K.R., Djarmati-Westenberger, A., Grunewald, A., 2011. Genetics of Parkinson's disease. *Seminars in neurology* 31, 433-440.

Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Matsumoto, T., 2006. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 787-793.

L-

Landwehrmeyer, G.B., Standaert, D.G., Testa, C.M., Penney, J.B., Jr., Young, A.B., 1995. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci* 15, 5297-5307.

Lang, A.E., Lozano, A.M., 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine* 339, 1044-1053.

Langston, J.W., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., Karluk, D., 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology* 46, 598-605.

Langston, J.W., Ballard, P., 1984. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *The Canadian journal of neurological sciences* 11, 160-165.

Langston, J.W., Ballard, P.A., Jr., 1983. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *The New England journal of medicine* 309, 310.

Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiaras, W.G., Pezzoli, G., Brice, A., Smith, R.J., 2008. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *American journal of human genetics* 82, 822-833.

Lavedan, C., 1998. The synuclein family. *Genome research* 8, 871-880.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., Gordon, S., 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.

Lazarou, M., Narendra, D.P., Jin, S.M., Tekle, E., Banerjee, S., Youle, R.J., 2013. PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *The Journal of cell biology* 200, 163-172.

Lazarou, M., Jin, S.M., Kane, L.A., Youle, R.J., 2012. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental cell* 22, 320-333.

Le Moine, C., Bloch, B., 1996. Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73, 131-143.

Le Moine, C., Bloch, B., 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *The Journal of comparative neurology* 355, 418-426.

Lee, H.J., Lee, S.J., 2002. Characterization of cytoplasmic alpha-synuclein aggregates. Fibril formation is tightly linked to the inclusion-forming process in cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 48976-48983.

Lee, J.Y., Nagano, Y., Taylor, J.P., Lim, K.L., Yao, T.P., 2010. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *The Journal of cell biology* 189, 671-679.

Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2006. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron* 52, 33-38.

Lee, V.M., Giasson, B.I., Trojanowski, J.Q., 2004. More than just two peas in a pod: common amyloidogenic properties of tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 27, 129-134.

Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., Youle, R.J., 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Molecular biology of the cell* 15, 5001-5011.

Leenders, K.L., Frackowiak, R.S., Quinn, N., Marsden, C.D., 1986. Brain energy metabolism and dopaminergic function in Huntington's disease measured in vivo using positron emission tomography. *Mov Disord* 1, 69-77.

Legendre-Guillemain, V., Metzler, M., Lemaire, J.F., Philie, J., Gan, L., Hayden, M.R., McPherson, P.S., 2005. Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *The Journal of biological chemistry* 280, 6101-6108.

Leininger, G.M., Backus, C., Sastry, A.M., Yi, Y.B., Wang, C.W., Feldman, E.L., 2006. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiology of disease* 23, 11-22.

Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., Chen, Z., Holloszy, J.O., Medeiros, D.M., Schmidt, R.E., Saffitz, J.E., Abel, E.D., Semenkovich, C.F., Kelly, D.P., 2005. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology* 3, e101.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson,

K.D., Polymeropoulos, M.H., 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451-452.

Lesage S., Brice A., 2012. Role of Mendelian genes in “sporadic” Parkinson’s disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 18S1; S66–S70

Lesage S, Anheim M, Condroyer C, Pollak P, Durif F, Dupuits C, Viallet F, Lohmann E, Corvol JC, Honoré A, Rivaud S, Vidailhet M, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. 2011. Large-scale screening of the Gaucher’s disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson’s disease. *Hum Mol Genet*;20:202–10.

Lesage, S., Leclere, L., Lohmann, E., Borg, M., Ruberg, M., Durr, A., Brice, A., 2007. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in siblings with Parkinson's disease. *Neuro-degenerative diseases* 4, 195-198.

Lesage, S., Ibanez, P., Lohmann, E., Pollak, P., Tison, F., Tazir, M., Leutenegger, A.L., Guimaraes, J., Bonnet, A.M., Agid, Y., Durr, A., Brice, A., 2005. G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Annals of neurology* 58, 784-787.

Lesort, M., Tucholski, J., Zhang, J., Johnson, G.V., 2000. Impaired mitochondrial function results in increased tissue transglutaminase activity in situ. *Journal of neurochemistry* 75, 1951-1961.

Li, H., Li, S.H., Johnston, H., Shelbourne, P.F., Li, X.J., 2000. Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nature genetics* 25, 385-389.

Li, H., Li, S.H., Cheng, A.L., Mangiarini, L., Bates, G.P., Li, X.J., 1999. Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Human molecular genetics* 8, 1227-1236.

Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature medicine* 14, 501-503.

Li, J.Y., Jahn, R., Dahlstrom, A., 1996. Axonal transport and targeting of the t-SNAREs SNAP-25 and syntaxin 1 in the peripheral nervous system. *European journal of cell biology* 70, 12-22.

Li, J.Y., Jahn, R., Dahlstrom, A., 1995. Rab3a, a small GTP-binding protein, undergoes fast anterograde transport but not retrograde transport in neurons. *European journal of cell biology* 67, 297-307.

Li, S.H., Cheng, A.L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H., Li, X.J., 2002. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Molecular and cellular biology* 22, 1277-1287.

Li, X.J., Li, S.H., Sharp, A.H., Nucifora, F.C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S.H., Ross, C.A., 1995. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402.

- Li, Y., Tomiyama, H., Sato, K., Hatano, Y., Yoshino, H., Atsumi, M., Kitaguchi, M., Sasaki, S., Kawaguchi, S., Miyajima, H., Toda, T., Mizuno, Y., Hattori, N., 2005. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 64, 1955-1957.
- Liang, H., Ward, W.F., 2006. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education* 30, 145-151.
- Liesa, M., Palacin, M., Zorzano, A., 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews* 89, 799-845.
- Lim, K.L., Lim, G.G., 2011. K63-linked ubiquitination and neurodegeneration. *Neurobiology of disease* 43, 9-16.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., Detloff, P.J., 2001. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 10, 137-144.
- Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B.M., 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism* 1, 361-370.
- Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., Cui, L., Manieri, M., Donovan, M.X., Wu, Z., Cooper, M.P., Fan, M.C., Rohas, L.M., Zavacki, A.M., Cinti, S., Shulman, G.I., Lowell, B.B., Kraic, D., Spiegelman, B.M., 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119, 121-135.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R., Spiegelman, B.M., 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.
- Lincoln, S., Vaughan, J., Wood, N., Baker, M., Adamson, J., Gwinn-Hardy, K., Lynch, T., Hardy, J., Farrer, M., 1999. Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson's disease. *Neuroreport* 10, 427-429.
- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., Saudou, F., 2013. Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J Neurosci* 33, 6298-6309.
- Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., Bossy-Wetzel, E., 2009. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell death and differentiation* 16, 899-909.
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., Millan, I., Shen, A., Saxton, W., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y., Lu, B., 2012. Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS genetics* 8, e1002537.

Liu S., Tian Z., Yin F., Zhao Q., Fan M., 2009. Generation of dopaminergic neurons from human fetal mesencephalic progenitors after co-culture with striatal-conditioned media and exposure to lowered oxygen. *Brain Res Bull.* Aug 28;80(1-2):62-8.

Liu, W., Acin-Perez, R., Geghman, K.D., Manfredi, G., Lu, B., Li, C., 2011. Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12920-12924.

Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., Lansbury, P.T., Jr., 2002. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209-218.

Lorincz, M.T., Zawistowski, V.A., 2009. Expanded CAG repeats in the murine Huntington's disease gene increases neuronal differentiation of embryonic and neural stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 40, 1-13.

Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., Wilkinson, K.D., 1990. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *The Journal of pathology* 161, 153-160.

Lozza, C., Marie, R.M., Baron, J.C., 2002. The metabolic substrates of bradykinesia and tremor in uncomplicated Parkinson's disease. *NeuroImage* 17, 688-699.

Lucking, C.B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N.W., Agid, Y., Brice, A., 2000. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England journal of medicine* 342, 1560-1567.

Ludolph, A.C., He, F., Spencer, P.S., Hammerstad, J., Sabri, M., 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *The Canadian journal of neurological sciences* 18, 492-498.

Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I., Kadenbach, B., 2001. Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem* 2, 392-403.

Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2009. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20051-20056.

Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.L., Trottier, Y., 2002. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Molecular cell* 10, 259-269.

Lunkes, A., Mandel, J.L., 1998. A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 7, 1355-1361.

Luthi-Carter, R., Hanson, S.A., Strand, A.D., Bergstrom, D.A., Chun, W., Peters, N.L., Woods, A.M., Chan, E.Y., Kooperberg, C., Krainc, D., Young, A.B., Tapscott, S.J., Olson, J.M., 2002.

Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human molecular genetics* 11, 1911-1926.

Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lammermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., Bouman, L., Vogt-Weisenhorn, D., Wurst, W., Tatzelt, J., Haass, C., Winklhofer, K.F., 2009. Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *The Journal of biological chemistry* 284, 22938-22951.

M-

Macht, M., Kaussner, Y., Moller, J.C., Stiasny-Kolster, K., Eggert, K.M., Kruger, H.P., Ellgring, H., 2007. Predictors of freezing in Parkinson's disease: a survey of 6,620 patients. *Mov Disord* 22, 953-956.

MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K., Abeliovich, A., 2006. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* 52, 587-593.

Madrazo, J.A., Kelly, D.P., 2008. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 44, 968-975.

Maiuri, T., Woloshansky, T., Xia, J., Truant, R., 2013. The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and Ran-dependent nuclear and ciliary export signal. *Human molecular genetics* 22, 1383-1394.

Majumder, P., Raychaudhuri, S., Chattopadhyay, B., Bhattacharyya, N.P., 2007. Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range. *Cellular and molecular neurobiology* 27, 1127-1145.

Mallucci, G., 2013. Spreading proteins in neurodegeneration: where do they take us? *Brain* 136, 994-995.

Manfredi, G., Yang, L., Gajewski, C.D., Mattiazzi, M., 2002. Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods (San Diego, Calif)* 26, 317-326.

Manfredsson, F.P., Burger, C., Sullivan, L.F., Muzyczka, N., Lewin, A.S., Mandel, R.J., 2007. rAAV-mediated nigral human parkin over-expression partially ameliorates motor deficits via enhanced dopamine neurotransmission in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 207, 289-301.

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., Bates, G.P., 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.

Mann, D.M., Yates, P.O., Hawkes, J., 1983. The pathology of the human locus ceruleus. *Clinical neuropathology* 2, 1-7.

Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., Di Monte, D.A., 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 277, 1641-1644.

Maraganore, D.M., Lesnick, T.G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M.C., Gasser, T., Kruger, R., Hattori, N., Mellick, G.D., Quattrone, A., Satoh, J., Toda, T., Wang, J., Ioannidis, J.P., de Andrade, M., Rocca, W.A., 2004. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Annals of neurology* 55, 512-521.

Marnett, L.J., 1999. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC scientific publications*, 17-27.

Martin, I., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2011. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annual review of genomics and human genetics* 12, 301-325.

Martin, L.J., Pan, Y., Price, A.C., Sterling, W., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Lee, M.K., 2006. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J Neurosci* 26, 41-50.

Martin, W.R., Hayden, M.R., 1987. Cerebral glucose and dopa metabolism in movement disorders. *The Canadian journal of neurological sciences* 14, 448-451.

Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S.U., Bredesen, D.E., Tufaro, F., Hayden, M.R., 1998. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nature genetics* 18, 150-154.

Maskos, U., 2010. Role of endogenous acetylcholine in the control of the dopaminergic system via nicotinic receptors. *Journal of neurochemistry* 114, 641-646.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., 2006. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Human reproduction (Oxford, England)* 21, 503-511.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., Tanaka, K., 2010. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology* 189, 211-221.

Maurice, N., Deniau, J.M., Glowinski, J., Thierry, A.M., 1998. Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the corticosubthalamic circuits. *J Neurosci* 18, 9539-9546.

McC Campbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., Fischbeck, K.H., 2000. CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Human molecular genetics* 9, 2197-2202.

McConoughey, S.J., Basso, M., Niatetskaya, Z.V., Sleiman, S.F., Smirnova, N.A., Langley, B.C., Mahishi, L., Cooper, A.J., Antonyak, M.A., Cerione, R.A., Li, B., Starkov, A., Chaturvedi, R.K., Beal, M.F., Coppola, G., Geschwind, D.H., Ryu, H., Xia, L., Iismaa, S.E., Pallos, J., Pasternack, R., Hils, M., Fan, J., Raymond, L.A., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Ratan, R.R., 2010. Inhibition of transglutaminase 2 mitigates transcriptional dysregulation in models of Huntington disease. *EMBO molecular medicine* 2, 349-370.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G., 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.

McGill, J.K., Beal, M.F., 2006. PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell* 127, 465-468.

McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.H., Li, X.J., 2006. Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *The Journal of biological chemistry* 281, 3552-3559.

McNaught, K.S., Olanow, C.W., Halliwell, B., Isacson, O., Jenner, P., 2001. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2, 589-594.

Mehmet H., 2000. Caspases find a new place to hide. *Nature* Jan 6;403(6765):29-30

Menalled, L.B., Sison, J.D., Wu, Y., Olivieri, M., Li, X.J., Li, H., Zeitlin, S., Chesselet, M.F., 2002. Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J Neurosci* 22, 8266-8276.

Mende-Mueller, L.M., Toneff, T., Hwang, S.R., Chesselet, M.F., Hook, V.Y., 2001. Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *J Neurosci* 21, 1830-1837.

Menzies, F.M., Yeniseetti, S.C., Min, K.T., 2005. Roles of Drosophila DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol* 15, 1578-1582.

Messmer, K., Reynolds, G.P., 1998. Increased peripheral benzodiazepine binding sites in the brain of patients with Huntington's disease. *Neuroscience letters* 241, 53-56.

Metzler, M., Legendre-Guillemain, V., Gan, L., Chopra, V., Kwok, A., McPherson, P.S., Hayden, M.R., 2001. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *The Journal of biological chemistry* 276, 39271-39276.

Meulener, M., Whitworth, A.J., Armstrong-Gold, C.E., Rizzu, P., Heutink, P., Wes, P.D., Pallanck, L.J., Bonini, N.M., 2005. Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol* 15, 1572-1577.

Milakovic, T., Johnson, G.V., 2005. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *The Journal of biological chemistry* 280, 30773-30782.

Miller, D.W., Hague, S.M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M.R., Singleton, A.B., 2004. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62, 1835-1838.

Miller, J.P., Holcomb, J., Al-Ramahi, I., de Haro, M., Gafni, J., Zhang, N., Kim, E., Sanhueza, M., Torcassi, C., Kwak, S., Botas, J., Hughes, R.E., Ellerby, L.M., 2010. Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67, 199-212.

- Mimoto, T., Miyazaki, K., Morimoto, N., Kurata, T., Satoh, K., Ikeda, Y., Abe, K., 2012. Impaired antioxydative Keap1/Nrf2 system and the downstream stress protein responses in the motor neuron of ALS model mice. *Brain research* 1446, 109-118.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Miyasaki, J.M., Al Hassan, K., Lang, A.E., Voon, V., 2007. Punding prevalence in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22, 1179-1181.
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T., Kagawa, Y., 1989. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 163, 1450-1455.
- Mochel, F., Durant, B., Meng, X., O'Callaghan, J., Yu, H., Brouillet, E., Wheeler, V.C., Humbert, S., Schiffmann, R., Durr, A., 2012. Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. *The Journal of biological chemistry* 287, 1361-1370.
- Mogenson, G.J., Jones, D.L., Yim, C.Y., 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology* 14, 69-97.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T., 1994a. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience letters* 180, 147-150.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., Nagatsu, T., 1994b. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience letters* 165, 208-210.
- Moller, T., 2010. Neuroinflammation in Huntington's disease. *J Neural Transm* 117, 1001-1008.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- Morais, V.A., Verstreken, P., Roethig, A., Smet, J., Snellinx, A., Vanbrabant, M., Haddad, D., Frezza, C., Mandemakers, W., Vogt-Weisenhorn, D., Van Coster, R., Wurst, W., Scorrano, L., De Strooper, B., 2009. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO molecular medicine* 1, 99-111.
- More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY, Choi DK, 2013. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*. Epub 2013 Jun 27
- Morel, Y., Mermoud, N., Barouki, R., 1999. An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Molecular and cellular biology* 19, 6825-6832.
- Morgan, N.V., Westaway, S.K., Morton, J.E., Gregory, A., Gissen, P., Sonek, S., Cangul, H., Coryell, J., Canham, N., Nardocci, N., Zorzi, G., Pasha, S., Rodriguez, D., Desguerre, I., Mubaidin, A., Bertini, E., Trembath, R.C., Simonati, A., Schanen, C., Johnson, C.A., Levinson,

B., Woods, C.G., Wilmot, B., Kramer, P., Gitschier, J., Maher, E.R., Hayflick, S.J., 2006. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nature genetics* 38, 752-754.

Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K., Mizuno, Y., 1998. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 51, 890-892.

Mortiboys, H., Thomas, K.J., Koopman, W.J., Klaffke, S., Abou-Sleiman, P., Olpin, S., Wood, N.W., Willems, P.H., Smeitink, J.A., Cookson, M.R., Bandmann, O., 2008. Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Annals of neurology* 64, 555-565.

Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U., 2000. Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7841-7846.

Muftuoglu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogus, H., Dalkara, T., Ozer, N., 2004. Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord* 19, 544-548.

Muller-Rischart, A.K., Pils, A., Beaudette, P., Patra, M., Hadian, K., Funke, M., Peis, R., Deinlein, A., Schweimer, C., Kuhn, P.H., Lichtenthaler, S.F., Motori, E., Hrelia, S., Wurst, W., Trumbach, D., Langer, T., Krappmann, D., Dittmar, G., Tatzelt, J., Winklhofer, K.F., 2012. The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Molecular cell* 49, 908-921.

Murata, H., Sakaguchi, M., Kataoka, K., Huh, N.H., 2013. SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria. *Molecular biology of the cell* 24, 2772-2784.

Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.

Myers, R.H., Vonsattel, J.P., Stevens, T.J., Cupples, L.A., Richardson, E.P., Martin, J.B., Bird, E.D., 1988. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38, 341-347.

Mytilineou, C., Werner, P., Molinari, S., Di Rocco, A., Cohen, G., Yahr, M.D., 1994. Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 8, 223-228.

N-

Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., Sesaki, H., Cheng, Y., Finkbeiner, S., Nussbaum, R.L., Masliah, E., Edwards, R.H., 2011. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 286, 20710-20726.

- Nakamura, K., Nemani, V.M., Wallender, E.K., Kaehlcke, K., Ott, M., Edwards, R.H., 2008. Optical reporters for the conformation of alpha-synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *J Neurosci* 28, 12305-12317.
- Nambu, A., Takada, M., Inase, M., Tokuno, H., 1996. Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J Neurosci* 16, 2671-2683.
- Nance, M.A., Myers, R.H., 2001. Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 7, 153-157.
- Narendra, D., Kane, L.A., Hauser, D.N., Fearnley, I.M., Youle, R.J., 2010a. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6, 1090-1106.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., Youle, R.J., 2010b. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology* 8, e1000298.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* 183, 795-803.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., Hayden, M.R., 1995. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.
- Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H., 2010. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65, 66-79.
- Neudorfer, O., Giladi, N., Elstein, D., Abrahamov, A., Turezkite, T., Aghai, E., Reches, A., Bembi, B., Zimran, A., 1996. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *Qjm* 89, 691-694.
- Neumann, J., Bras, J., Deas, E., O'Sullivan, S.S., Parkkinen, L., Lachmann, R.H., Li, A., Holton, J., Guerreiro, R., Paudel, R., Segarane, B., Singleton, A., Lees, A., Hardy, J., Houlden, H., Revesz, T., Wood, N.W., 2009. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 132, 1783-1794.
- Niclis, J., Trounson, A.O., Dottori, M., Ellidson, A., Bottomley, S.P., Verlinsky, Y., Cram, D., 2009. Human embryonic stem cell models of Huntington disease. *Reproductive biomedicine online* 19, 106-113.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., Suter, U., 2005. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *The Journal of cell biology* 170, 1067-1078.
- Nisoli, E., Carruba, M.O., 2006. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of cell science* 119, 2855-2862.

Niu, J., Yu, M., Wang, C., Xu, Z., 2012. Leucine-rich repeat kinase 2 disturbs mitochondrial dynamics via Dynamin-like protein. *Journal of neurochemistry* 122, 650-658.

Noda, K., 1968. Differences in Na and Ca ion effluxes between the cell portion and the fibre portion in the spinal ganglion-root preparation obtained from the bullfrog. *The Kurume medical journal* 15, 1-14.

Nucifora, F.C., Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A., 2001. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* (New York, N.Y. 291, 2423-2428.

Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.

O-

Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M.F., Mandel, J.L., 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* (New York, N.Y. 252, 1097-1102.

Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Benitez-Temino, B., Blesa, F.J., Guridi, J., Marin, C., Rodriguez, M., 2008. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3, S548-559.

Okatsu K, Uno M, Koyano F, Go E, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N., 2013. A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J Biol Chem.* Dec 20;288(51):36372-84. Epub 2013 Nov 4.

Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima, K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K., Matsuda, N., 2012a. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature communications* 3, 1016.

Okatsu K, Iemura S, Koyano F, Go E, Kimura M, Natsume T, Tanaka K, Matsuda N, 2012b. Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 9;428(1):197-202. Epub 2012 Oct 13.

Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y.S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Matsuda, N., 2010. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* 15, 887-900.

Okazawa, H., 2003. Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell Mol Life Sci* 60, 1427-1439.

Okui, M., Yamaki, A., Takayanagi, A., Kudoh, J., Shimizu, N., Shimizu, Y., 2005. Transcription factor single-minded 2 (SIM2) is ubiquitinated by the RING-IBR-RING-type E3 ubiquitin ligases. *Experimental cell research* 309, 220-228.

Okun, M.S., Thommi, N., 2004. Americo Negrette (1924 to 2003): diagnosing Huntington disease in Venezuela. *Neurology* 63, 340-343.

Olanow, C.W., Perl, D.P., DeMartino, G.N., McNaught, K.S., 2004. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet neurology* 3, 496-503.

Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC., 1996 A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15;93(21):11400-6.

Oster, A.M., Thomas, B., Terman, D., Fall, C.P., 2011. The low conductance mitochondrial permeability transition pore confers excitability and CICR wave propagation in a computational model. *Journal of theoretical biology* 273, 216-231.

Osterloh, J.M., Yang, J., Rooney, T.M., Fox, A.N., Adalbert, R., Powell, E.H., Sheehan, A.E., Avery, M.A., Hackett, R., Logan, M.A., MacDonald, J.M., Ziegenfuss, J.S., Milde, S., Hou, Y.J., Nathan, C., Ding, A., Brown, R.H., Jr., Conforti, L., Coleman, M., Tessier-Lavigne, M., Zuchner, S., Freeman, M.R., 2012. dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science (New York, N.Y)* 337, 481-484.

Otera, H., Ishihara, N., Mihara, K., 2013. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 1256-1268.

Otera, H., Mihara, K., 2011. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *Journal of biochemistry* 149, 241-251.

Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., Mihara, K., 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 191, 1141-1158.

Oules, B., Del Prete, D., Greco, B., Zhang, X., Lauritzen, I., Sevalle, J., Moreno, S., Paterlini-Brechot, P., Trebak, M., Checler, F., Benfenati, F., Chami, M., 2012. Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J Neurosci* 32, 11820-11834.

Outeiro, T.F., Klucken, J., Bercury, K., Tetzlaff, J., Putcha, P., Oliveira, L.M., Quintas, A., McLean, P.J., Hyman, B.T., 2009. Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *PLoS one* 4, e6906.

Ozelius, L.J., Senthil, G., Saunders-Pullman, R., Ohmann, E., Deligtisch, A., Tagliati, M., Hunt, A.L., Klein, C., Henick, B., Hailpern, S.M., Lipton, R.B., Soto-Valencia, J., Risch, N., Bressman, S.B., 2006. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *The New England journal of medicine* 354, 424-425.

P-

Pacelli, C., De Rasmio, D., Signorile, A., Grattagliano, I., di Tullio, G., D'Orazio, A., Nico, B., Comi, G.P., Ronchi, D., Ferranini, E., Pirolo, D., Seibel, P., Schubert, S., Gaballo, A., Villani, G., Cocco, T., 2011. Mitochondrial defect and PGC-1alpha dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 1041-1053.

Pagliarini, D.J., Dixon, J.E., 2006. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends in biochemical sciences* 31, 26-34.

Paisan-Ruiz, C., Bhatia, K.P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N.W., Hardy, J., Houlden, H., Singleton, A., Schneider, S.A., 2009. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Annals of neurology* 65, 19-23.

Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J.R., Nicholl, D., Carrera, I.M., Pena, A.S., de Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J.F., Perez-Tur, J., Wood, N.W., Singleton, A.B., 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44, 595-600.

Pal, A., Severin, F., Lommer, B., Shevchenko, A., Zerial, M., 2006. Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *The Journal of cell biology* 172, 605-618.

Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., Shen, J., 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 279, 18614-18622.

Paladini, C.A., Celada, P., Tepper, J.M., 1999. Striatal, pallidal, and pars reticulata evoked inhibition of nigrostriatal dopaminergic neurons is mediated by GABA(A) receptors in vivo. *Neuroscience* 89, 799-812.

Pallos, J., Bodai, L., Lukacsovich, T., Purcell, J.M., Steffan, J.S., Thompson, L.M., Marsh, J.L., 2008. Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 17, 3767-3775.

Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., Ryan, M.T., 2011. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO reports* 12, 565-573.

Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., Greenamyre, J.T., 2005a. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *The Journal of biological chemistry* 280, 42026-42035.

Panov, A.V., Lund, S., Greenamyre, J.T., 2005b. Ca²⁺-induced permeability transition in human lymphoblastoid cell mitochondria from normal and Huntington's disease individuals. *Molecular and cellular biochemistry* 269, 143-152.

Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Greenamyre, J.T., 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature neuroscience* 5, 731-736.

Paoletti, P., Vila, I., Rife, M., Lizcano, J.M., Alberch, J., Gines, S., 2008. Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 28, 10090-10101.

Parent, A., Sato, F., Wu, Y., Gauthier, J., Levesque, M., Parent, M., 2000. Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends in neurosciences* 23, S20-27.

Parent, A., Hazrati, L.N., 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 91-127.

Parent, A., Hazrati, L.N., 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 128-154.

Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., Chung, J., 2006. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157-1161.

Park, J., Kim, S.Y., Cha, G.H., Lee, S.B., Kim, S., Chung, J., 2005. *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene* 361, 133-139.

Parker, J.A., Connolly, J.B., Wellington, C., Hayden, M., Dausset, J., Neri, C., 2001. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13318-13323.

Parker, W.D., Jr., Parks, J.K., Swerdlow, R.H., 2008. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain research* 1189, 215-218.

Parker, W.D., Jr., Boyson, S.J., Luder, A.S., Parks, J.K., 1990. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology* 40, 1231-1234.

Parr-Brownlie, L.C., Hyland, B.I., 2005. Bradykinesia induced by dopamine D2 receptor blockade is associated with reduced motor cortex activity in the rat. *J Neurosci* 25, 5700-5709.

Pasternak, O., Westin, C.F., Bouix, S., Seidman, L.J., Goldstein, J.M., Woo, T.U., Petryshen, T.L., Meshulam-Gately, R.I., McCarley, R.W., Kikinis, R., Shenton, M.E., Kubicki, M., 2012. Excessive extracellular volume reveals a neurodegenerative pattern in schizophrenia onset. *J Neurosci* 32, 17365-17372.

Paterna, J.C., Leng, A., Weber, E., Feldon, J., Bueler, H., 2007. DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Mol Ther* 15, 698-704.

Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B.I., Norris, E.H., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Ischiropoulos, H., 2001. Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrative insult. *J Neurosci* 21, 8053-8061.

Pearse, B.M., Robinson, M.S., 1990. Clathrin, adaptors, and sorting. *Annual review of cell biology* 6, 151-171.

Peavy, G.M., Jacobson, M.W., Goldstein, J.L., Hamilton, J.M., Kane, A., Gamst, A.C., Lessig, S.L., Lee, J.C., Corey-Bloom, J., 2010. Cognitive and functional decline in Huntington's disease: dementia criteria revisited. *Mov Disord* 25, 1163-1169.

Penney, J.B., Jr., Young, A.B., 1982. Quantitative autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington disease. *Neurology* 32, 1391-1395.

Perez, F.A., Palmiter, R.D., 2005. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2174-2179.

Perluigi M., Poon H.F., Maragos W., Pierce W.M., Klein J.B., Calabrese V., Cini C., De Marco C., Butterfield D.A., 2005. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics*. Dec;4(12):1849-61. Epub 2005 Jun 20.

Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., Studer, L., 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12543-12548.

Perrin, V., Regulier, E., Abbas-Terki, T., Hassig, R., Brouillet, E., Aebischer, P., Luthi-Carter, R., Deglon, N., 2007. Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in lentiviral-based rat models of Huntington's disease. *Mol Ther* 15:903-911.

Perrin, V., Dufour, N., Raoul, C., Hassig, R., Brouillet, E., Aebischer, P., Luthi-Carter, R., Deglon, N., 2009. Implication of the JNK pathway in a rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 215:191-200.

Perutz, M.F., 1995. Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 1, 718-721.

Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Harding, M., Bellen, H., Mardon, G., 2004. *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development (Cambridge, England)* 131, 2183-2194.

Peters, J.M., Franke, W.W., Kleinschmidt, J.A., 1994. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 269, 7709-7718.

Petersen, A., Mani, K., Brundin, P., 1999. Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Experimental neurology* 157, 1-18.

Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P.J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J., Cookson, M.R., 2002. Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36, 1007-1019.

Piantadosi, C.A., Carraway, M.S., Babiker, A., Suliman, H.B., 2008. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circulation research* 103, 1232-1240.

Piccoli, C., Sardanelli, A., Scrima, R., Ripoli, M., Quarato, G., D'Aprile, A., Bellomo, F., Scacco, S., De Michele, G., Filla, A., Iuso, A., Boffoli, D., Capitanio, N., Papa, S., 2008. Mitochondrial respiratory dysfunction in familiar parkinsonism associated with PINK1 mutation. *Neurochemical research* 33, 2565-2574.

Piccoli, G., Condliffe, S.B., Bauer, M., Giesert, F., Boldt, K., De Astis, S., Meixner, A., Sarioglu, H., Vogt-Weisenhorn, D.M., Wurst, W., Gloeckner, C.J., Matteoli, M., Sala, C., Ueffing, M., 2011. LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool. *J Neurosci* 31, 2225-2237.

Picconi, B., Piccoli, G., Calabresi, P., 2012. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Advances in experimental medicine and biology* 970, 553-572.

Picconi, B., Centonze, D., Rossi, S., Bernardi, G., Calabresi, P., 2004a. Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain* 127, 1661-1669.

Picconi, B., Gardoni, F., Centonze, D., Mauceri, D., Cenci, M.A., Bernardi, G., Calabresi, P., Di Luca, M., 2004b. Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J Neurosci* 24, 5283-5291.

Pickart, C.M., 2001a. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* 70, 503-533.

Pickart, C.M., 2001b. Ubiquitin enters the new millennium. *Molecular cell* 8, 499-504.

Pickrell, A.M., Pinto, M., Hida, A., Moraes, C.T., 2011. Striatal dysfunctions associated with mitochondrial DNA damage in dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 31, 17649-17658.

Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., Wood, N.W., Martins, L.M., Downward, J., 2007. The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nature cell biology* 9, 1243-1252.

Poewe, W., Wenning, G., 2002. The differential diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 9 Suppl 3, 23-30.

Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., Ross, C.A., 2002. Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *The Journal of biological chemistry* 277, 41032-41037.

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L., Duvoisin, R.C., 1996. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science (New York, N.Y)* 274, 1197-1199.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y)* 276, 2045-2047.

Ponsen, M.M., Stoffers, D., Booij, J., van Eck-Smit, B.L., Wolters, E., Berendse, H.W., 2004. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Annals of neurology* 56, 173-181.

Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S., Pallanck, L., 2010. The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS one* 5, e10054.

Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J., Pallanck, L.J., 2008. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1638-1643.

Poon, H.F., Frasier, M., Shreve, N., Calabrese, V., Wolozin, B., Butterfield, D.A., 2005. Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 18, 492-498.

Pouladi, M.A., Morton, A.J., Hayden, M.R., 2013. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 708-721.

Powell, T.P., Cowan, W.M., 1954. The connexions of the midline and intralaminar nuclei of the thalamus of the rat. *Journal of anatomy* 88, 307-319.

Pratt, G., Rechsteiner, M., 2008. Proteasomes cleave at multiple sites within polyglutamine tracts: activation by PA28gamma(K188E). *The Journal of biological chemistry* 283, 12919-12925.

Prediger, R.D., 2010. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1, S205-220.

Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.S., Li, L., 2007. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS biology* 5, e172.

Prigge, J.R., Schmidt, E.E., 2007. HAP1 can sequester a subset of TBP in cytoplasmic inclusions via specific interaction with the conserved TBP(CORE). *BMC molecular biology* 8, 76.

Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., Jette, N., 2012. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 27, 1083-1091.

Priyadarshini, M., Tuimala, J., Chen, Y.C., Panula, P., 2013. A zebrafish model of PINK1 deficiency reveals key pathway dysfunction including HIF signaling. *Neurobiology of disease* 54, 127-138.

Przedborski, S., 2004. Clarification: Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19, 118.

Puigserver, P., Spiegelman, B.M., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews* 24, 78-90.

Q-

Qin, L., Liu, Y., Hong, J.S., Crews, F.T., 2013. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia* 61, 855-868.

Quik, M., Bordia, T., O'Leary, K., 2007. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochemical pharmacology* 74, 1224-1234.

Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *The Journal of biological chemistry* 287, 27255-27264.

R-

Radermacher, K.A., Winkler, K., Langhauser, F., Altenhofer, S., Kleikers, P., Hermans, J.J., Hrabe de Angelis, M., Kleinschnitz, C., Schmidt, H.H., 2013. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 18, 1418-1427.

Radulescu, A.E., Cleveland, D.W., 2010. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends in cell biology* 20, 214-222.

Ragland, M., Hutter, C., Zabetian, C., Edwards, K., 2009. Association between the ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 gene (UCHL1) S18Y variant and Parkinson's Disease: a HuGE review and meta-analysis. *American journal of epidemiology* 170, 1344-1357.

Rakovic, A., Grunewald, A., Kottwitz, J., Bruggemann, N., Pramstaller, P.P., Lohmann, K., Klein, C., 2011. Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS one* 6, e16746.

Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I., Kubisch, C., 2006. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics* 38, 1184-1191.

Ramsey, C.P., Tsika, E., Ischiropoulos, H., Giasson, B.I., 2010. DJ-1 deficient mice demonstrate similar vulnerability to pathogenic Ala53Thr human alpha-syn toxicity. *Human molecular genetics* 19, 1425-1437.

Ramsey, C.P., Giasson, B.I., 2007. Role of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Implications for treatment. *Drugs & aging* 24, 95-105.

Rangone, H., Poizat, G., Troncoso, J., Ross, C.A., MacDonald, M.E., Saudou, F., Humbert, S., 2004. The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *The European journal of neuroscience* 19, 273-279.

Rankin, C.A., Roy, A., Zhang, Y., Richter, M., 2011. Parkin, A Top Level Manager in the Cell's Sanitation Department. *The open biochemistry journal* 5, 9-26.

Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 27, 119-145.

Rascol, O., Clanet, M., Montastruc, J.L., Simonetta, M., Soulier-Esteve, M.J., Doyon, B., Rascol, A., 1989. Abnormal ocular movements in Parkinson's disease. Evidence for involvement of dopaminergic systems. *Brain* 112 (Pt 5), 1193-1214.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics* 36, 585-595.

Ravikumar, B., Duden, R., Rubinsztein, D.C., 2002. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human molecular genetics* 11, 1107-1117.

Raymond, L.A., Andre, V.M., Cepeda, C., Gladding, C.M., Milnerwood, A.J., Levine, M.S., 2011. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* 198, 252-273.

Rebecchi, M.J., Pentylala, S.N., 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews* 80, 1291-1335.

Regulier, E., Pereira de Almeida, L., Sommer, B., Aebischer, P., Deglon, N., 2002. Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Human gene therapy* 13, 1981-1990.

Ren, G., Xin, S., Li, S., Zhong, H., Lin, S., 2011. Disruption of LRRK2 does not cause specific loss of dopaminergic neurons in zebrafish. *PLoS one* 6, e20630.

Ren, Y., Zhao, J., Feng, J., 2003. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* 23, 3316-3324.

Requena, J.R., Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids* 25, 221-226.

Richfield, E.K., Maguire-Zeiss, K.A., Cox, C., Gilmore, J., Voorn, P., 1995. Reduced expression of preproenkephalin in striatal neurons from Huntington's disease patients. *Annals of neurology* 37, 335-343.

Richfield, E.K., O'Brien, C.F., Eskin, T., Shoulson, I., 1991. Heterogeneous dopamine receptor changes in early and late Huntington's disease. *Neuroscience letters* 132, 121-126.

Richter-Landsberg, C., 2008. The cytoskeleton in oligodendrocytes. Microtubule dynamics in health and disease. *J Mol Neurosci* 35, 55-63.

Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6465-6467.

Richter, J.D., Sonenberg, N., 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477-480.

Ridley, R.M., Frith, C.D., Crow, T.J., Conneally, P.M., 1988. Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *Journal of medical genetics* 25, 589-595.

Riedel, M., Goldbaum, O., Richter-Landsberg, C., 2009. alpha-Synuclein promotes the recruitment of tau to protein inclusions in oligodendroglial cells: effects of oxidative and proteolytic stress. *J Mol Neurosci* 39, 226-234.

Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V.N., Kazantsev, A., Marsh, J.L., Sullivan, P.G., Steffan, J.S., Sensi, S.L., Thompson, L.M., 2007. The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Human molecular genetics* 16, 61-77.

Rodriguez-Gomez, J.A., Lu, J.Q., Velasco, I., Rivera, S., Zoghbi, S.S., Liow, J.S., Musachio, J.L., Chin, F.T., Toyama, H., Seidel, J., Green, M.V., Thanos, P.K., Ichise, M., Pike, V.W., Innis, R.B., McKay, R.D., 2007. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 918-928.

Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews* 8, 519-529.

Roos, R.A., 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet journal of rare diseases* 5, 40.

Rosen, K.M., Veereshwarayya, V., Moussa, C.E., Fu, Q., Goldberg, M.S., Schlossmacher, M.G., Shen, J., Querfurth, H.W., 2006. Parkin protects against mitochondrial toxins and beta-amyloid accumulation in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 12809-12816.

Ross, O.A., Soto, A.I., Vilarino-Guell, C., Heckman, M.G., Diehl, N.N., Hulihan, M.M., Aasly, J.O., Sando, S., Gibson, J.M., Lynch, T., Krygowska-Wajs, A., Opala, G., Barcikowska, M., Czyzewski, K., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., Farrer, M.J., 2008. Genetic variation of Omi/HtrA2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 14, 539-543.

Rott, R., Szargel, R., Haskin, J., Shani, V., Shainskaya, A., Manov, I., Liani, E., Avraham, E., Engelender, S., 2008. Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 3316-3328.

Rowland, A.A., Voeltz, G.K., 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews* 13, 607-625.

Rubchinsky, L.L., Kopell, N., Sigvardt, K.A., 2003. Modeling facilitation and inhibition of competing motor programs in basal ganglia subthalamic nucleus-pallidal circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14427-14432.

S-

Saha, S., Guillily, M.D., Ferree, A., Lanceta, J., Chan, D., Ghosh, J., Hsu, C.H., Segal, L., Raghavan, K., Matsumoto, K., Hisamoto, N., Kuwahara, T., Iwatsubo, T., Moore, L., Goldstein, L., Cookson, M., Wolozin, B., 2009. LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29, 9210-9218.

Sahlender, D.A., Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J., Buss, F., 2005. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *The Journal of cell biology* 169, 285-295.

- Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J.Y., Jin, Y., Matsumoto, K., Hisamoto, N., 2007. LRK-1, a *C. elegans* PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr Biol* 17, 592-598.
- Sallinen, V., Kolehmainen, J., Priyadarshini, M., Toleikyte, G., Chen, Y.C., Panula, P., 2010. Dopaminergic cell damage and vulnerability to MPTP in Pink1 knockdown zebrafish. *Neurobiology of disease* 40, 93-101.
- Samann, J., Hegermann, J., von Gromoff, E., Eimer, S., Baumeister, R., Schmidt, E., 2009. *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry* 284, 16482-16491.
- Sanchez, I., Mahlke, C., Yuan, J., 2003. Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421, 373-379.
- Sandebring, A., Dehvari, N., Perez-Manso, M., Thomas, K.J., Karpilovski, E., Cookson, M.R., Cowburn, R.F., Cedazo-Minguez, A., 2009a. Parkin deficiency disrupts calcium homeostasis by modulating phospholipase C signalling. *The FEBS journal* 276, 5041-5052.
- Sandebring, A., Thomas, K.J., Beilina, A., van der Brug, M., Cleland, M.M., Ahmad, R., Miller, D.W., Zambrano, I., Cowburn, R.F., Behbahani, H., Cedazo-Minguez, A., Cookson, M.R., 2009b. Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. *PloS one* 4, e5701.
- Santel, A., Fuller, M.T., 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of cell science* 114, 867-874.
- Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P.G., Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 2001. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60, 161-172.
- Sapp, E., Penney, J., Young, A., Aronin, N., Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 1999. Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58, 165-173.
- Sarikas, A., Hartmann, T., Pan, Z.Q., 2011. The cullin protein family. *Genome biology* 12, 220.
- Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., Rubinsztein, D.C., 2007. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 282, 5641-5652.
- Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J., Rubinsztein, D.C., 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology* 170, 1101-1111.
- Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., Tanaka, K., 2006. 14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase. *The EMBO journal* 25, 211-221.

Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., Greenberg, M.E., 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66.

Sawa, A., Wiegand, G.W., Cooper, J., Margolis, R.L., Sharp, A.H., Lawler, J.F., Jr., Greenamyre, J.T., Snyder, S.H., Ross, C.A., 1999. Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nature medicine* 5, 1194-1198.

Sawamoto, N., Piccini, P., Hotton, G., Pavese, N., Thielemans, K., Brooks, D.J., 2008. Cognitive deficits and striato-frontal dopamine release in Parkinson's disease. *Brain* 131, 1294-1302.

Scannevin, R.H., Huganir, R.L., 2000. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 1, 133-141.

Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., Ghidoni, R., 2008. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell death and differentiation* 15, 1318-1329.

Scarpulla, R.C., Vega, R.B., Kelly, D.P., 2012. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23, 459-466.

Schagger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal* 19, 1777-1783.

Schagger, H., von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* 199, 223-231.

Schapira, A.H., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1990. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 55, 2142-2145.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269.

Schenck, C.H., Bundlie, S.R., Mahowald, M.W., 1996. Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* 46, 388-393.

Scherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F., Agid, Y., 1989. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Annals of neurology* 26, 551-557.

Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., Wanker, E.E., 1997. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90, 549-558.

Schilling, B., Aggeler, R., Schulenberg, B., Murray, J., Row, R.H., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., 2005. Mass spectrometric identification of a novel phosphorylation site in subunit NDUFA10 of bovine mitochondrial complex I. *FEBS letters* 579, 2485-2490.

Schilling, G., Savonenko, A.V., Klevytska, A., Morton, J.L., Tucker, S.M., Poirier, M., Gale, A., Chan, N., Gonzales, V., Slunt, H.H., Coonfield, M.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ross, C.A., Borchelt, D.R., 2004. Nuclear-targeting of mutant huntingtin fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice. *Human molecular genetics* 13, 1599-1610.

Schilling, G., Becher, M.W., Sharp, A.H., Jinnah, H.A., Duan, K., Kotzok, J.A., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Cooper, J.K., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Ross, C.A., Borchelt, D.R., 1999. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Human molecular genetics* 8, 397-407.

Schluter, O.M., Basu, J., Sudhof, T.C., Rosenmund, C., 2006. Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 26, 1239-1246.

Schluter, O.M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C., Sudhof, T.C., 2004. A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J Neurosci* 24, 6629-6637.

Schoepfer, R., Monyer, H., Sommer, B., Wisden, W., Sprengel, R., Kuner, T., Lomeli, H., Herb, A., Kohler, M., Burnashev, N., et al., 1994. Molecular biology of glutamate receptors. *Progress in neurobiology* 42, 353-357.

Schon, E.A., Przedborski, S., 2011. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 70, 1033-1053.

Schumacher, J.M., Hantraye, P., Brownell, A.L., Riche, D., Madras, B.K., Davenport, P.D., Maziere, M., Elmaleh, D.R., Brownell, G.L., Isacson, O., 1992. A primate model of Huntington's disease: functional neural transplantation and CT-guided stereotactic procedures. *Cell transplantation* 1, 313-322.

Schwartz, R.K., Huston, J.P., 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in neurobiology* 50, 275-331.

Sedvall, G., Karlsson, P., Lundin, A., Anvret, M., Suhara, T., Halldin, C., Farde, L., 1994. Dopamine D1 receptor number--a sensitive PET marker for early brain degeneration in Huntington's disease. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 243, 249-255.

Sehgal, P.B., Lee, J.E., 2011. Protein trafficking dysfunctions: Role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation* 1, 17-32.

Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C., Krainc, D., 2011. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 31, 5970-5976.

Senard, J.M., Rai, S., Lapeyre-Mestre, M., Brefel, C., Rascol, O., Rascol, A., Montastruc, J.L., 1997. Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 63, 584-589.

Senut, M.C., Suhr, S.T., Kaspar, B., Gage, F.H., 2000. Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *J Neurosci* 20, 219-229.

Seo, H., Sonntag, K.C., Kim, W., Cattaneo, E., Isacson, O., 2007. Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells. *PloS one* 2, e238.

Seo, H., Sonntag, K.C., Isacson, O., 2004. Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Annals of neurology* 56, 319-328.

Shao, J., Diamond, M.I., 2007. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics* 16 Spec No. 2, R115-123.

Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M.P., Walsh, D.M., Hamilton, J.A., Selkoe, D.J., 2003. The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 37, 583-595.

Shavali, S., Brown-Borg, H.M., Ebadi, M., Porter, J., 2008. Mitochondrial localization of alpha-synuclein protein in alpha-synuclein overexpressing cells. *Neuroscience letters* 439, 125-128.

Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., Abeliovich, A., 2004. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS biology* 2, e362.

Sheng, D., Qu, D., Kwok, K.H., Ng, S.S., Lim, A.Y., Aw, S.S., Lee, C.W., Sung, W.K., Tan, E.K., Lufkin, T., Jesuthasan, S., Sinnakaruppan, M., Liu, J., 2010. Deletion of the WD40 domain of LRRK2 in Zebrafish causes Parkinsonism-like loss of neurons and locomotive defect. *PLoS genetics* 6, e1000914.

Sherer, T.B., Betarbet, R., Stout, A.K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A.V., Cookson, M.R., Greenamyre, J.T., 2002. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci* 22, 7006-7015.

Shiba-Fukushima, K., Imai, Y., Yoshida, S., Ishihama, Y., Kanao, T., Sato, S., Hattori, N., 2012. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific reports* 2, 1002.

Shiba, K., Arai, T., Sato, S., Kubo, S., Ohba, Y., Mizuno, Y., Hattori, N., 2009. Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochemical and biophysical research communications* 383, 331-335.

Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degterev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., MacDonald, M., Yankner, B., Yuan, J., 2006. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *The Journal of biological chemistry* 281, 14474-14485.

Shill, H., Stacy, M., 1998. Respiratory function in Parkinson's disease. *Clinical neuroscience (New York, N.Y)* 5, 131-135.

Shimojo, M., 2008. Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued. *The Journal of biological chemistry* 283, 34880-34886.

Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S., Selkoe, D.J., 2001. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y)* 293, 263-269.

Shin, J.H., Ko, H.S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y.I., Pletinkova, O., Troconso, J.C., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2011. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 144, 689-702.

Shin, N., Jeong, H., Kwon, J., Heo, H.Y., Kwon, J.J., Yun, H.J., Kim, C.H., Han, B.S., Tong, Y., Shen, J., Hatano, T., Hattori, N., Kim, K.S., Chang, S., Seol, W., 2008. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Experimental cell research* 314, 2055-2065.

Shirendeb, U.P., Calkins, M.J., Manczak, M., Anekonda, V., Dufour, B., McBride, J.L., Mao, P., Reddy, P.H., 2012. Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Human molecular genetics* 21, 406-420.

Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molloy E, Harrison M, Lew M; Parkinson Study Group, 2002. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol.* Oct;59(10):1541-50.

Sicot, G., Gomes-Pereira, M., 2013. RNA toxicity in human disease and animal models: from the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies. *Biochimica et biophysica acta* 1832, 1390-1409.

Siebels, I., Drose, S., 2013. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochimica et biophysica acta* 1827, 1156-1164.

Siller, K.H., Doe, C.Q., 2009. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature cell biology* 11, 365-374.

Simonin, C., Duru, C., Salleron, J., Hincker, P., Charles, P., Delval, A., Youssov, K., Burnouf, S., Azulay, J.P., Verny, C., Scherer, C., Tranchant, C., Goizet, C., Debruxelles, S., Defebvre, L., Sablonniere, B., Romon-Rousseaux, M., Buee, L., Destee, A., Godefroy, O., Durr, A., Landwehrmeyer, B., Bachoud-Levi, A.C., Richard, F., Blum, D., Krystkowiak, P., 2013. Association between caffeine intake and age at onset in Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 58, 179-182.

Singhrao, S.K., Neal, J.W., Morgan, B.P., Gasque, P., 1999. Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Experimental neurology* 159, 362-376.

Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y)* 302, 841.

Slupe A.M., Merrill R.A., Flippo K.H., Lobas M.A., Houtman J.C., Strack S., 2013. A calcineurin docking motif (LXVP) in dynamin-related protein 1 contributes to mitochondrial fragmentation and ischemic neuronal injury. *J Biol Chem.* Apr 26;288(17):12353-65.

Smith, A.D., Bolam, J.P., 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends in neurosciences* 13, 259-265.

Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A., 2006. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature neuroscience* 9, 1231-1233.

Smith, Y., Parent, A., Seguela, P., Descarries, L., 1987. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *The Journal of comparative neurology* 259, 50-64.

Snapp, E.L., Hegde, R.S., 2006. Rational design and evaluation of FRET experiments to measure protein proximities in cells, *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino et al., Chapter 17 Unit 17 19.*

Snyder, S.H., D'Amato, R.J., 1985. Predicting Parkinson's disease. *Nature* 317, 198-199.

Solans, A., Zambrano, A., Rodriguez, M., Barrientos, A., 2006. Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Human molecular genetics* 15, 3063-3081.

Soldati, C., Bithell, A., Johnston, C., Wong, K.Y., Stanton, L.W., Buckley, N.J., 2013. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* 124, 418-430.

Song, C., Zhang, Y., Parsons, C.G., Liu, Y.F., 2003. Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 278, 33364-33369.

Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Masliah, E., Ellisman, M., Rouiller, I., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Perkins, G., Bossy-Wetzler, E., 2011. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature medicine* 17, 377-382.

Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., Chan, D.C., 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of cell biology* 178, 749-755.

Sonntag, K.C., Pruszak, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R., Isacson, O., 2007. Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 411-418.

Sorolla, M.A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., Cabisco, E., 2008. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free radical biology & medicine* 45, 667-678.

Sotrel, A., Paskevich, P.A., Kiely, D.K., Bird, E.D., Williams, R.S., Myers, R.H., 1991. Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurology* 41, 1117-1123.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.

Spira, P.J., Sharpe, D.M., Halliday, G., Cavanagh, J., Nicholson, G.A., 2001. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Annals of neurology* 49, 313-319.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.

St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B., Spiegelman, B.M., 2003. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 26597-26603.

Stack, C., Ho, D., Wille, E., Calingasan, N.Y., Williams, C., Liby, K., Sporn, M., Dumont, M., Beal, M.F., 2010. Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Free radical biology & medicine* 49, 147-158.

Stack, E.C., Matson, W.R., Ferrante, R.J., 2008. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 79-92.

Standaert, D.G., Testa, C.M., Young, A.B., Penney, J.B., Jr., 1994. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *The Journal of comparative neurology* 343, 1-16.

Starkov, A.A., Fiskum, G., 2003. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of neurochemistry* 86, 1101-1107.

Staropoli, J.F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., Abeliovich, A., 2003. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 37, 735-749.

Steele, S.L., Prykhodzhiy, S.V., Berman, J.N., 2013. Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases: a review. *Transl Res.*

Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P.P., Thompson, L.M., Marsh, J.L., 2004. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science (New York, N.Y)* 304, 100-104.

Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D.E., Jackson, G.R., Marsh,

J.L., Thompson, L.M., 2001. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.

Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., Thompson, L.M., 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6763-6768.

Steinlechner, S., Stahlberg, J., Volkel, B., Djarmati, A., Hagenah, J., Hiller, A., Hedrich, K., Konig, I., Klein, C., Lencer, R., 2007. Co-occurrence of affective and schizophrenia spectrum disorders with PINK1 mutations. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78, 532-535.

Sterky, F.H., Lee, S., Wibom, R., Olson, L., Larsson, N.G., 2011. Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12937-12942.

Stern, M.B., Doty, R.L., Dotti, M., Corcoran, P., Crawford, D., McKeown, D.A., Adler, C., Gollomp, S., Hurtig, H., 1994. Olfactory function in Parkinson's disease subtypes. *Neurology* 44, 266-268.

Stichel, C.C., Zhu, X.R., Bader, V., Linnartz, B., Schmidt, S., Lubbert, H., 2007. Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Human molecular genetics* 16, 2377-2393.

Stowers, R.S., Megeath, L.J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A., Schwarz, T.L., 2002. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron* 36, 1063-1077.

Stoy, N., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T.W., Darlington, L.G., 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* 93, 611-623.

Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B., Kruger, R., 2005. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 14, 2099-2111.

Suen, D.F., Norris, K.L., Youle, R.J., 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development* 22, 1577-1590.

Sugars, K.L., Rubinsztein, D.C., 2003. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19, 233-238.

Sun, L., Chen, Z.J., 2004. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current opinion in cell biology* 16, 119-126.

Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P.H., Liu, Y.F., 2001. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *The Journal of biological chemistry* 276, 24713-24718.

Suzuki, M., Nagai, Y., Wada, K., Koike, T., 2012. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochemical and biophysical research communications* 429, 18-23.

Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Cassarino, D.S., Binder, D.R., Bennett, J.P., Jr., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Parker, W.D., Jr., 2001. Biochemical analysis of cybrids expressing mitochondrial DNA from Contursi kindred Parkinson's subjects. *Experimental neurology* 169, 479-485.

Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Miller, S.W., Tuttle, J.B., Trimmer, P.A., Sheehan, J.P., Bennett, J.P., Jr., Davis, R.E., Parker, W.D., Jr., 1996. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 40, 663-671.

Swinn, L., Schrag, A., Viswanathan, R., Bloem, B.R., Lees, A., Quinn, N., 2003. Sweating dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 18, 1459-1463.

Szabo, J., 1970. Projections from the body of the caudate nucleus in the rhesus monkey. *Experimental neurology* 27, 1-15.

T-

Tabrizi, S.J., Workman, J., Hart, P.E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 2000. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Annals of neurology* 47, 80-86.

Tabrizi, S.J., Cleeter, M.W., Xuereb, J., Taanman, J.W., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 1999. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Annals of neurology* 45, 25-32.

Tain, L.S., Mortiboys, H., Tao, R.N., Ziviani, E., Bandmann, O., Whitworth, A.J., 2009. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nature neuroscience* 12, 1129-1135.

Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Arigo, S.M., Takahashi, K., Ariga, H., 2004. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO reports* 5, 213-218.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., Youle, R.J., 2010. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology* 191, 1367-1380.

Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M., Nukina, N., 2004. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature medicine* 10, 148-154.

Tandberg, E., Larsen, J.P., Aarsland, D., Cummings, J.L., 1996. The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Archives of neurology* 53, 175-179.

Tang T.S., Guo C., Wang H., Chen X., Bezprozvanny I., 2009. Neuroprotective effects of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor C-terminal fragment in a Huntington's disease mouse model. *J Neurosci.* 2009 Feb 4;29(5):1257-66.

Tang, T.S., Chen, X., Liu, J., Bezprozvanny, I., 2007. Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 27, 7899-7910.

Tang, T.S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinas, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., Bezprozvanny, I., 2005. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2602-2607.

Tang, T.S., Tu, H., Wang, Z., Bezprozvanny, I., 2003. Modulation of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor function by protein kinase a and protein phosphatase 1alpha. *J Neurosci* 23, 403-415.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S.S., Corr, S.C., Haneklaus, M., Caffrey, B.E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F.C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C.T., Lin, H., Masters, S.L., Gottlieb, E., Kelly, V.P., Clish, C., Auron, P.E., Xavier, R.J., O'Neill, L.A., 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496, 238-242.

Tanner, C.M., Ottman, R., Goldman, S.M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., Langston, J.W., 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *Jama* 281, 341-346.

Tanner, C.M., 1989. The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 12, 49-54.

Tansey, M.G., McCoy, M.K., Frank-Cannon, T.C., 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology* 208, 1-25.

Tayebi, N., Callahan, M., Madike, V., Stubblefield, B.K., Orvisky, E., Krasnewich, D., Fillano, J.J., Sidransky, E., 2001. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Molecular genetics and metabolism* 73, 313-321.

Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.K., Wu, D.C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5473-5478.

Thakur, A.K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V.M., Byeon, I.J., Anjum, D.H., Kodali, R., Creamer, T.P., Conway, J.F., Gronenborn, A.M., Wetzel, R., 2009. Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nature structural & molecular biology* 16, 380-389.

Thannickal, T.C., Lai, Y.Y., Siegel, J.M., 2007. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain* 130, 1586-1595.

Thomas, M., Hayflick, S.J., Jankovic, J., 2004. Clinical heterogeneity of neurodegeneration with brain iron accumulation (Hallervorden-Spatz syndrome) and pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Mov Disord* 19, 36-42.

Thompson, C.L., Drewery, D.L., Atkins, H.D., Stephenson, F.A., Chazot, P.L., 2000. Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate receptor NR1, NR2A, NR2B and NR2C/D subunits in the adult mammalian cerebellum. *Neuroscience letters* 283, 85-88.

Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Lau, A.L., Massey, A., Hayden, M.R., Zeitlin, S.O., Finkbeiner, S., Green, K.N., LaFerla, F.M., Bates, G., Huang, L., Patterson, P.H., Lo, D.C., Cuervo, A.M., Marsh, J.L., Steffan, J.S., 2009. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *The Journal of cell biology* 187, 1083-1099.

Tinazzi, M., Del Vesco, C., Fincati, E., Ottaviani, S., Smania, N., Moretto, G., Fiaschi, A., Martino, D., Defazio, G., 2006. Pain and motor complications in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77, 822-825.

Tiscornia, G., Vivas, E.L., Izpisua Belmonte, J.C., 2011. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nature medicine* 17, 1570-1576.

Tondera, D., Santel, A., Schwarzer, R., Dames, S., Giese, K., Klippel, A., Kaufmann, J., 2004. Knockdown of MTP18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 31544-31555.

Toulorge, D., Guerreiro, S., Hild, A., Maskos, U., Hirsch, E.C., Michel, P.P., 2011. Neuroprotection of midbrain dopamine neurons by nicotine is gated by cytoplasmic Ca²⁺. *FASEB J* 25, 2563-2573.

Trancikova, A., Ramonet, D., Moore, D.J., 2011a. Genetic mouse models of neurodegenerative diseases. *Progress in molecular biology and translational science* 100, 419-482.

Trancikova, A., Tsika, E., Moore, D.J., 2011b. Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* 16, 896-919.

Tretiakoff CM (1919). Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Ref Type: thesis dissertation.

Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V.C., Sharp, A.H., Persichetti, F., Cattaneo, E., MacDonald, M.E., 2000. Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Human molecular genetics* 9, 2799-2809.

Tretter, L., Adam-Vizi, V., 2004. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* 24, 7771-7778.

Trinh, J., Farrer, M., 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 9, 445-454.

Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1994. Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Annals of the New York Academy of Sciences* 747, 92-109.

Truant, R., Atwal, R.S., Burtnik, A., 2007. Nucleocytoplasmic trafficking and transcription effects of huntingtin in Huntington's disease. *Progress in neurobiology* 83, 211-227.

Turjanski, N., Weeks, R., Dolan, R., Harding, A.E., Brooks, D.J., 1995. Striatal D1 and D2 receptor binding in patients with Huntington's disease and other choreas. A PET study. *Brain* 118 (Pt 3), 689-696.

Turner, R.S., Grafton, S.T., McIntosh, A.R., DeLong, M.R., Hoffman, J.M., 2003. The functional anatomy of parkinsonian bradykinesia. *NeuroImage* 19, 163-179.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* 27, 433-446.

U-

Uhl, G.R., Walther, D., Mash, D., Faucheux, B., Javoy-Agid, F., 1994. Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Annals of neurology* 35, 494-498.

Uhl, G.R., Hedreen, J.C., Price, D.L., 1985. Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35, 1215-1218.

Um, J.W., Min, D.S., Rhim, H., Kim, J., Paik, S.R., Chung, K.C., 2006. Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2. *The Journal of biological chemistry* 281, 3595-3603.

Ungar, D., Hughson, F.M., 2003. SNARE protein structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 19, 493-517.

V-

van der Burg, J.M., Bacos, K., Wood, N.I., Lindqvist, A., Wierup, N., Woodman, B., Wamsteeker, J.I., Smith, R., Deierborg, T., Kuhar, M.J., Bates, G.P., Mulder, H., Erlanson-Albertsson, C., Morton, A.J., Brundin, P., Petersen, A., Bjorkqvist, M., 2008. Increased metabolism in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 29, 41-51.

Van Humbeeck, C., Cornelissen, T., Hofkens, H., Mandemakers, W., Gevaert, K., De Strooper, B., Vandenberghe, W., 2011. Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J Neurosci* 31, 10249-10261.

Van Raamsdonk, J.M., Pearson, J., Bailey, C.D., Rogers, D.A., Johnson, G.V., Hayden, M.R., Leavitt, B.R., 2005. Cystamine treatment is neuroprotective in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Journal of neurochemistry* 95, 210-220.

Varkonyi, J., Rosenbaum, H., Baumann, N., MacKenzie, J.J., Simon, Z., Aharon-Peretz, J., Walker, J.M., Tayebi, N., Sidransky, E., 2003. Gaucher disease associated with parkinsonism: four further case reports. *American journal of medical genetics* 116A, 348-351.

Ved, R., Saha, S., Westlund, B., Perier, C., Burnam, L., Sluder, A., Hoener, M., Rodrigues, C.M., Alfonso, A., Steer, C., Liu, L., Przedborski, S., Wolozin, B., 2005. Similar patterns of mitochondrial vulnerability and rescue induced by genetic modification of alpha-synuclein, parkin, and DJ-1 in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* 280, 42655-42668.

Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T.W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., DiFiglia, M., 1998. Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Experimental neurology* 152, 34-40.

Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., Goldberg, A.L., 2004. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Molecular cell* 14, 95-104.

Venugopal, R., Jaiswal, A.K., 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14960-14965.

Vercammen, L., Van der Perren, A., Vaudano, E., Gijsbers, R., Debyser, Z., Van den Haute, C., Baekelandt, V., 2006. Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Mol Ther* 14, 716-723.

Verdaguer, E., Garcia-Jorda, E., Canudas, A.M., Dominguez, E., Jimenez, A., Pubill, D., Escubedo, E., Pallas, J.C., Camins, A., 2002. Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13, 413-416.

Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F.P., et al., 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905-914.

Vignais, P.V., 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428-1459.

Vila, M., Przedborski, S., 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4, 365-375.

Vilain, S., Esposito, G., Haddad, D., Schaap, O., Dobрева, M.P., Vos, M., Van Meensel, S., Morais, V.A., De Strooper, B., Verstreken, P., 2012. The yeast complex I equivalent NADH dehydrogenase rescues pink1 mutants. *PLoS genetics* 8, e1002456.

Vilarino-Guell, C., Wider, C., Ross, O.A., Dachsel, J.C., Kachergus, J.M., Lincoln, S.J., Soto-Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., Wilhoite, G.J., Bacon, J.A., Behrouz, B., Melrose, H.L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D.M., Conibear, E., Wasserman, W.W., Aasly, J.O., Burkhard, P.R., Djaldetti, R., Ghika, J., Hentati, F., Krygowska-Wajs, A., Lynch, T., Melamed, E., Rajput, A.,

Rajput, A.H., Solida, A., Wu, R.M., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., Vingerhoets, F., Farrer, M.J., 2011. VPS35 mutations in Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89, 162-167.

Vingerhoets, F.J., Schulzer, M., Calne, D.B., Snow, B.J., 1997. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? *Annals of neurology* 41, 58-64.

Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., Magrane, J., Moore, D.J., Dawson, V.L., Grailhe, R., Dawson, T.M., Li, C., Tieu, K., Przedborski, S., 2010. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 378-383.

Vives-Bauza, C., Andreu, A.L., Manfredi, G., Beal, M.F., Janetzky, B., Gruenewald, T.H., Lin, M.T., 2002. Sequence analysis of the entire mitochondrial genome in Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 290, 1593-1601.

Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry* 68, 1015-1068.

Voglis, G., Tavernarakis, N., 2006. The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO reports* 7, 1104-1110.

Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2011. Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57-71.

Von Coelln, R., Thomas, B., Andrabi, S.A., Lim, K.L., Savitt, J.M., Saffary, R., Stirling, W., Bruno, K., Hess, E.J., Lee, M.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2006. Inclusion body formation and neurodegeneration are parkin independent in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *J Neurosci* 26, 3685-3696.

Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J.M., Lim, K.L., Sasaki, M., Hess, E.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2004. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10744-10749.

von Horsten, S., Schmitt, I., Nguyen, H.P., Holzmann, C., Schmidt, T., Walther, T., Bader, M., Pabst, R., Kobbe, P., Krotova, J., Stiller, D., Kask, A., Vaarmann, A., Rathke-Hartlieb, S., Schulz, J.B., Grasshoff, U., Bauer, I., Vieira-Saecker, A.M., Paul, M., Jones, L., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, B., Bauer, A., Li, X.J., Riess, O., 2003. Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 12, 617-624.

Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 1998. Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57, 369-384.

Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., Richardson, E.P., Jr., 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 44, 559-577.

W-

- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H., Wanker, E.E., 2001a. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Molecular biology of the cell* 12, 1393-1407.
- Waelter, S., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Nordhoff, E., Lurz, R., Goehler, H., Gauss, C., Sathasivam, K., Bates, G.P., Lehrach, H., Wanker, E.E., 2001b. The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Human molecular genetics* 10, 1807-1817.
- Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E.R., von Mollard, G.F., Jahn, R., 1995. The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *The Journal of cell biology* 128, 637-645.
- Walker, F.O., 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-228.
- Wang, B., Goode, J., Best, J., Meltzer, J., Schilman, P.E., Chen, J., Garza, D., Thomas, J.B., Montminy, M., 2008. The insulin-regulated CREB coactivator TORC promotes stress resistance in *Drosophila*. *Cell metabolism* 7, 434-444.
- Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., Li, D., Wang, B., Zhu, Y., Cao, C., Zhou, J., Chen, Q., 2011. Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry* 286, 11649-11658.
- Wang, H., Lim, P.J., Karbowski, M., Monteiro, M.J., 2009. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Human molecular genetics* 18, 737-752.
- Wang, J., Wang, C.E., Orr, A., Tydlacka, S., Li, S.H., Li, X.J., 2008. Impaired ubiquitin-proteasome system activity in the synapses of Huntington's disease mice. *The Journal of cell biology* 180, 1177-1189.
- Wang, J.L., Xiao, B., Cui, X.X., Guo, J.F., Lei, L.F., Song, X.W., Shen, L., Jiang, H., Yan, X.X., Pan, Q., Long, Z.G., Xia, K., Tang, B.S., 2009. Analysis of SCA2 and SCA3/MJD repeats in Parkinson's disease in mainland China: genetic, clinical, and positron emission tomography findings. *Mov Disord* 24, 2007-2011.
- Wang, J.Y., Wen, L.L., Huang, Y.N., Chen, Y.T., Ku, M.C., 2006. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Current pharmaceutical design* 12, 3521-3533.
- Wang, X., Yan, M.H., Fujioka, H., Liu, J., Wilson-Delfosse, A., Chen, S.G., Perry, G., Casadesus, G., Zhu, X., 2012. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Human molecular genetics* 21, 1931-1944.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., Schwarz, T.L., 2011. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147, 893-906.
- Wang, Y., Wu, J., Wang, Z., 2006. Akt binds to and phosphorylates phospholipase C-gamma1 in response to epidermal growth factor. *Molecular biology of the cell* 17, 2267-2277.

- Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L., Bonini, N.M., 1999. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nature genetics* 23, 425-428.
- Wasiak, S., Zunino, R., McBride, H.M., 2007. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *The Journal of cell biology* 177, 439-450.
- Wasilewski, M., Scorrano, L., 2009. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20, 287-294.
- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., Rubinsztein, D.C., 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278, 25009-25013.
- Weeks, R.A., Piccini, P., Harding, A.E., Brooks, D.J., 1996. Striatal D1 and D2 dopamine receptor loss in asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Annals of neurology* 40, 49-54.
- Weihofen, A., Ostaszewski, B., Minami, Y., Selkoe, D.J., 2008. Pink1 Parkinson mutations, the Cdc37/Hsp90 chaperones and Parkin all influence the maturation or subcellular distribution of Pink1. *Human molecular genetics* 17, 602-616.
- Wellington, C.L., Hayden, M.R., 2000. Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clinical genetics* 57, 1-10.
- Wellington, C.L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., Nicholson, D.W., Bredesen, D.E., Hayden, M.R., 2000. Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 19831-19838.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Trifiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., Rowland, K.J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, N., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C.A., Nicholson, D.W., Bredesen, D.E., Hayden, M.R., 1998. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *The Journal of biological chemistry* 273, 9158-9167.
- Wenning, G.K., Litvan, I., Jankovic, J., Granata, R., Mangone, C.A., McKee, A., Poewe, W., Jellinger, K., Ray Chaudhuri, K., D'Olhaberriague, L., Pearce, R.K., 1998. Natural history and survival of 14 patients with corticobasal degeneration confirmed at postmortem examination. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 64, 184-189.
- Wenning, G.K., Ben Shlomo, Y., Magalhaes, M., Daniel, S.E., Quinn, N.P., 1994. Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain* 117 (Pt 4), 835-845.
- Wenzel, D.M., Kleivit, R.E., 2012. Following Ariadne's thread: a new perspective on RBR ubiquitin ligases. *BMC biology* 10, 24.

Wenzel, D.M., Lissounov, A., Brzovic, P.S., Klevit, R.E., 2011. UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* 474, 105-108.

West, A.B., Kapatos, G., O'Farrell, C., Gonzalez-de-Chavez, F., Chiu, K., Farrer, M.J., Maidment, N.T., 2004. N-myc regulates parkin expression. *The Journal of biological chemistry* 279, 28896-28902.

Weydt, P., Pineda, V.V., Torrence, A.E., Libby, R.T., Satterfield, T.F., Lazarowski, E.R., Gilbert, M.L., Morton, G.J., Bammler, T.K., Strand, A.D., Cui, L., Beyer, R.P., Easley, C.N., Smith, A.C., Krainc, D., Luquet, S., Sweet, I.R., Schwartz, M.W., La Spada, A.R., 2006. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell metabolism* 4, 349-362.

Wheeler, V.C., White, J.K., Gutekunst, C.A., Vrbanac, V., Weaver, M., Li, X.J., Li, S.H., Yi, H., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Hersch, S., Auerbach, W., Joyner, A.L., MacDonald, M.E., 2000. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Human molecular genetics* 9, 503-513.

Whitworth, A.J., Lee, J.R., Ho, V.M., Flick, R., Chowdhury, R., McQuibban, G.A., 2008. Rhomboid-7 and HtrA2/Omi act in a common pathway with the Parkinson's disease factors Pink1 and Parkin. *Disease models & mechanisms* 1, 168-174; discussion 173.

Whitworth, A.J., Theodore, D.A., Greene, J.C., Benes, H., Wes, P.D., Pallanck, L.J., 2005. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8024-8029.

Wider, C., Wszolek, Z.K., 2007. Clinical genetics of Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism & related disorders* 13 Suppl 3, S229-232.

Wild, E.J., Tabrizi, S.J., 2007. Huntington's disease phenocopy syndromes. *Current opinion in neurology* 20, 681-687.

Williams, D.R., Watt, H.C., Lees, A.J., 2006. Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77, 468-473.

Wintermeyer, P., Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Voitalla, D., Berg, D., Becker, G., Leroy, E., Polymeropoulos, M., Berger, K., Przuntek, H., Schols, L., Epplen, J.T., Riess, O., 2000. Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *Neuroreport* 11, 2079-2082.

Wolters, E., 2008. Variability in the clinical expression of Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 266, 197-203.

Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A., Nunnari, J., 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *The Journal of cell biology* 160, 303-311.

Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., Abramov, A.Y., Miljan, E.A., Keen, G., Stanyer, L., Hargreaves, I., Klupsch, K., Deas, E., Downward, J., Mansfield, L., Jat, P., Taylor, J., Heales, S.,

Duchen, M.R., Latchman, D., Tabrizi, S.J., Wood, N.W., 2008. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PloS one* 3, e2455.

Wood, N.I., Pallier, P.N., Wanderer, J., Morton, A.J., 2007. Systemic administration of Congo red does not improve motor or cognitive function in R6/2 mice. *Neurobiology of disease* 25, 342-353.

Wouters, F.S. and Bastiaens, P.I., 2006. Imaging Protein-Protein Interactions by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Curr Protoc Neurosci. Feb*, Chapter 5; Unit 5-22.

Wright Willis, A., Evanoff, B.A., Lian, M., Criswell, S.R., Racette, B.A., 2010. Geographic and ethnic variation in Parkinson disease: a population-based study of US Medicare beneficiaries. *Neuroepidemiology* 34, 143-151.

Wszolek, Z.K., Pfeiffer, R.F., Tsuboi, Y., Uitti, R.J., McComb, R.D., Stoessl, A.J., Strongosky, A.J., Zimprich, A., Muller-Myhsok, B., Farrer, M.J., Gasser, T., Calne, D.B., Dickson, D.W., 2004. Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology* 62, 1619-1622.

Wu, Y., Richard, S., Parent, A., 2000. The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neuroscience research* 38, 49-62.

Wu, Z., Huang, X., Feng, Y., Handschin, C., Feng, Y., Gullicksen, P.S., Bare, O., Labow, M., Spiegelman, B., Stevenson, S.C., 2006. Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1 α transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14379-14384.

Wu, Z., Puigserver, P., Spiegelman, B.M., 1999. Transcriptional activation of adipogenesis. *Current opinion in cell biology* 11, 689-694.

X-

Xi, Y., Ryan, J., Noble, S., Yu, M., Yilbas, A.E., Ekker, M., 2010. Impaired dopaminergic neuron development and locomotor function in zebrafish with loss of pink1 function. *The European journal of neuroscience* 31, 623-633.

Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., Truant, R., 2003. Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Human molecular genetics* 12, 1393-1403.

Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Choo, Y.S., Ma, H., Tang, C., Xia, K., Jiang, W., Ronai, Z., Zhuang, X., Zhang, Z., 2009. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *The Journal of clinical investigation* 119, 650-660.

Xu W, Guo T, Zhang Y, Jiang X, Zhang Y, Zen K, Yu B, Zhang CY., 2011. The inhibitory effect of dexamethasone on platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration through up-regulating PGC-1 α expression. *Exp Cell Res.* 2011 May 1;317(8):1083-92. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.10.006. Epub 2010 Oct 15.

Xun, Z., Sowell, R.A., Kaufman, T.C., Clemmer, D.E., 2008. Quantitative proteomics of a presymptomatic A53T alpha-synuclein *Drosophila* model of Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics* 7, 1191-1203.

Xun, Z., Sowell, R.A., Kaufman, T.C., Clemmer, D.E., 2007. Protein expression in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Journal of proteome research* 6, 348-357.

Y-

Yamada, M., Mizuno, Y., Mochizuki, H., 2005. Parkin gene therapy for alpha-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. *Human gene therapy* 16, 262-270.

Yamamoto, A., Friedlein, A., Imai, Y., Takahashi, R., Kahle, P.J., Haass, C., 2005. Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 280, 3390-3399.

Yamamoto, A., Lucas, J.J., Hen, R., 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57-66.

Yang, D., Wang, C.E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., Yang, H., Fan, P., O'Neill, A., Gu, W., Yi, H., Li, S., Lai, L., Li, X.J., 2010. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human molecular genetics* 19, 3983-3994.

Yang, S.H., Cheng, P.H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.J., Cheng, E.C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., Fang, Z.H., Smith, Y., Bachevalier, J., Zola, S.M., Li, S.H., Li, X.J., Chan, A.W., 2008a. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453, 921-924.

Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H., Lu, B., 2008. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7070-7075.

Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H., Lu, B., 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10793-10798.

Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B., 2005. Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13670-13675.

Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., Lu, B., 2003. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37, 911-924.

Yao, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z.Q., Ma, Y., Gaston, B., Palmer, L.A., Rockenstein, E.M., Zhang, Z., Masliah, E., Uehara, T., Lipton, S.A., 2004. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 10810-10814.

Yavich, L., Jakala, P., Tanila, H., 2006. Abnormal compartmentalization of norepinephrine in mouse dentate gyrus in alpha-synuclein knockout and A30P transgenic mice. *Journal of neurochemistry* 99, 724-732.

Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S., Jakala, P., 2004. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci* 24, 11165-11170.

Yokoyama, Y., Beckman, J.S., Beckman, T.K., Wheat, J.K., Cash, T.G., Freeman, B.A., Parks, D.A., 1990. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *The American journal of physiology* 258, G564-570.

Yoshii, S.R., Kishi, C., Ishihara, N., Mizushima, N., 2011. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 286, 19630-19640.

Yoshino, H., Nakagawa-Hattori, Y., Kondo, T., Mizuno, Y., 1992. Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 4, 27-34.

Yu-Taeger, L., Petrasch-Parwez, E., Osmand, A.P., Redensek, A., Metzger, S., Clemens, L.E., Park, L., Howland, D., Calaminus, C., Gu, X., Pichler, B., Yang, X.W., Riess, O., Nguyen, H.P., 2012. A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *J Neurosci* 32, 15426-15438.

Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Xu, S., Liu, C., Gao, Y., Yang, H., Ueda, K., Chan, P., 2007. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* 145, 539-555.

Yu, W., Sun, Y., Guo, S., Lu, B., 2011. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Human molecular genetics* 20, 3227-3240.

Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Lipton, S.A., Ellisman, M., Perkins, G.A., Bossy-Wetzel, E., 2007. Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell death and differentiation* 14, 462-471.

Z-

Zabel, C., Mao, L., Woodman, B., Rohe, M., Wacker, M.A., Klare, Y., Koppelstatter, A., Nebrich, G., Klein, O., Grams, S., Strand, A., Luthi-Carter, R., Hartl, D., Klose, J., Bates, G.P., 2009. A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 8, 720-734.

Zainelli, G.M., Ross, C.A., Troncoso, J.C., Muma, N.A., 2003. Transglutaminase cross-links in intranuclear inclusions in Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62, 14-24.

- Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., Saudou, F., 2008. Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Human molecular genetics* 17, 3837-3846.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D.G., de Yebenes, J.G., 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* 55, 164-173.
- Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., Efstratiadis, A., 1995. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature genetics* 11, 155-163.
- Zesiewicz, T.A., Sullivan, K.L., Hauser, R.A., 2006. Nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Expert review of neurotherapeutics* 6, 1811-1822.
- Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A.J., Hu, W., Feng, Z., 2011. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16259-16264.
- Zhang, J., Ney, P.A., 2010. Reticulocyte mitophagy: monitoring mitochondrial clearance in a mammalian model. *Autophagy* 6, 405-408.
- Zhang, J., Perry, G., Smith, M.A., Robertson, D., Olson, S.J., Graham, D.G., Montine, T.J., 1999. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *The American journal of pathology* 154, 1423-1429.
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Ueda, K., Yu, S., Yang, H., 2008. Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain research* 1244, 40-52.
- Zhang, S.F., Hennessey, T., Yang, L., Starkova, N.N., Beal, M.F., Starkov, A.A., 2011. Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease. *Neuro-degenerative diseases* 8, 194-201.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.S., Zhang, J., 2005. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19, 533-542.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13354-13359.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlen, P., Tomilin, N., Shupliakov, O., Lendahl, U., Nister, M., 2011. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *The EMBO journal* 30, 2762-2778.
- Zhao, J., Ren, Y., Jiang, Q., Feng, J., 2003. Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes. *Journal of cell science* 116, 4011-4019.

Zheng, B., Liao, Z., Locascio, J.J., Lesniak, K.A., Roderick, S.S., Watt, M.L., Eklund, A.C., Zhang-James, Y., Kim, P.D., Hauser, M.A., Grunblatt, E., Moran, L.B., Mandel, S.A., Riederer, P., Miller, R.M., Federoff, H.J., Wullner, U., Papapetropoulos, S., Youdim, M.B., Cantuti-Castelvetri, I., Young, A.B., Vance, J.M., Davis, R.L., Hedreen, J.C., Adler, C.H., Beach, T.G., Graeber, M.B., Middleton, F.A., Rochet, J.C., Scherzer, C.R., 2010. PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Science translational medicine* 2, 52ra73.

Zheng, Z., Li, A., Holmes, B.B., Marasa, J.C., Diamond, M.I., 2013. An N-terminal nuclear export signal regulates trafficking and aggregation of Huntingtin (Htt) protein exon 1. *The Journal of biological chemistry* 288, 6063-6071.

Zhou, B., Westaway, S.K., Levinson, B., Johnson, M.A., Gitschier, J., Hayflick, S.J., 2001. A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nature genetics* 28, 345-349.

Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., Dauer, W., Schon, E.A., Przedborski, S., 2008. The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 12022-12027.

Zhou, W., Zhu, M., Wilson, M.A., Petsko, G.A., Fink, A.L., 2006. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *Journal of molecular biology* 356, 1036-1048.

Zhou, W., Freed, C.R., 2005. DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. *The Journal of biological chemistry* 280, 43150-43158.

Zimprich, A., Benet-Pages, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S.H., Offman, M.N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E.C., Lichtner, P., Rossle, S.C., Klopp, N., Wolf, E., Seppi, K., Pirker, W., Presslauer, S., Mollenhauer, B., Katzenschlager, R., Foki, T., Hotzy, C., Reinthaler, E., Harutyunyan, A., Kralovics, R., Peters, A., Zimprich, F., Brucke, T., Poewe, W., Auff, E., Trenkwalder, C., Rost, B., Ransmayr, G., Winkelmann, J., Meitinger, T., Strom, T.M., 2011. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89, 168-175.

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K., Gasser, T., 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601-607.

Ziviani, E., Tao, R.N., Whitworth, A.J., 2010. *Drosophila parkin* requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5018-5023.

Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., Rigamonti, D., Cattaneo, E., 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics* 35, 76-83.

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E., 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y)* 293, 493-498.