



HAL
open science

Perte de fonction de la voie de signalisation dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson - Mécanismes et conséquences

Maxime Jacoupy

► **To cite this version:**

Maxime Jacoupy. Perte de fonction de la voie de signalisation dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson - Mécanismes et conséquences. Neurobiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066387 . tel-01878349

HAL Id: tel-01878349

<https://theses.hal.science/tel-01878349>

Submitted on 21 Sep 2018

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 n°158 (ED3C)

Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière

CNRS UMR 7225 / INSERM U 1127 / UPMC-P6 UMR S 1127

**Bases Moléculaires, Physiopathologie et Traitement
des Maladies Neurodégénératives**

Perte de fonction de la voie de signalisation « PINK1/Parkine » dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson

Mécanismes et conséquences

Par Maxime JACOUPY

Thèse de doctorat de Neurobiologie

Dirigée par Olga CORTI

Présentée et soutenue publiquement le 19 Septembre 2016

Devant un jury composé de :

Bezard, Erwan, Directeur de recherche, Rapporteur
Plun-Favreau, Hélène, Senior Lecturer, Rapporteur
Benard, Giovanni, Chargé de recherche, Examineur
Birman, Serge, Directeur de recherche, Examineur
Trembleau, Alain, Professeur, Président

Remerciements

« *La pierre n'a point d'espoir d'être autre chose que pierre. Mais de collaborer, elle s'assemble et devient temple* », disait si bien Antoine de Saint-Exupéry.

Il est l'heure de faire le bilan de ces quatre années et je suis de plus en plus que convaincu que la recherche ne peut être un travail solitaire. Le chemin parcouru jusqu'ici ne m'aurait jamais paru réalisable sans les magnifiques rencontres qui ont contribué, par leur soutien, leurs encouragements, leur bonne humeur, leurs conseils et critiques, aussi bien à mon développement personnel que scientifique.

Il m'est ainsi agréable d'adresser mes sincères remerciements à l'ensemble de ces personnes.

Je remercie tout d'abord très chaleureusement ma directrice de thèse, Madame Olga Corti, qui, à l'inverse de Giovanni a pris le risque de m'accepter en tant que stagiaire M2, puis de tant que doctorant. Merci Olga pour ces presque-5 années. Merci pour ton encadrement, ton soutien, ton aide, merci d'être resté aussi tard ces derniers soirs. Certes, certaines périodes ont été compliquées – je me rappelle en particulier de la réponse aux référés pour le papier sur HSD17 β 10 - mais je ne regrette rien. Je suis intimement convaincu que quasi 100% de ce que je connais du monde scientifique vient de toi. Merci pour tout.

Merci également au Professeur Alexis Brice pour son accueil au sein de cet immense équipe. C'était un souhait, et c'est devenu une magnifique opportunité de travailler dans un environnement aussi favorable que l'ICM. Merci également pour mon magnifique surnom, qui est devenu pour certain mon nom d'usage.

Je voudrais remercier spécifiquement Madame Hélène Plun-Favreau et Monsieur Erwan Bezard d'avoir accepté la lourde tâche de référer et d'évaluer mon manuscrit de thèse. Merci par avance pour vos remarques, qui, je suis certain, seront extrêmement constructives.

Merci à Monsieur Serge Birman et à Monsieur Giovanni Benard pour l'intérêt que vous avez porté à l'égard de mon projet en vous engageant en tant qu'examineur, malgré vos occupations.

Merci également à Monsieur Trembleau. J'imagine à quel point votre emploi du temps doit être serré au mois de septembre. Donc encore merci d'avoir pu vous libérer afin de présider ma thèse.

La thèse, mais en générale la vie de laboratoire nécessite une gestion technique et administrative de toute épreuve. Et encore je pèse les mots. Merci alors à Antoine, Lydia et Marie-Luce d'avoir été présent pour que tout se passe si bien.

Mon arrivée au laboratoire n'était pas des plus simples. Avec un bagage essentiellement génétique, intégrer une équipe travaillant presque exclusivement avec des techniques de biologie moléculaire, de biologie cellulaire et d'imagerie n'a pas été de tout repos. Je souhaite alors remercier sincèrement mes collègues-experts de l'époque sans qui je ne saurais toujours rien: merci à Giulia, Rosa, Zoi, Stéphanie et Clément.

Merci à l'équipe de chez Servier, ma deuxième maison à l'ICM. Je pense en particulier à Denis pour ta gentillesse, et forcément pour ta compétence mais ça tout le monde la connaît. Merci également à Francis, Bénédicte, Patricia, Nelly, Stéphane. Re-merci Clément. Certes, je ne vais pas encore rester longtemps, mais ne vous y méprenez pas, vous ne vous êtes pas encore débarrassé de moi.

Un énorme merci à mes collègues d'aujourd'hui pour les discussions scientifiques, mais surtout surtout surtout extrascientifiques. C'est « presque » toujours une joie de me lever le matin pour venir travailler et ceci, bah c'est forcément grâce à vous. Ce paragraphe ne se sera évidemment pas suffisant pour vous dire à quel point je vous apprécie, mais je vais faire de mon mieux et dans la mesure du possible, essayer de n'oublier personne.

Merci tout d'abord à nos PI, Fred, la science infuse, c'est toujours impressionnant de discuter avec toi, Giovannin et son amour de l'alliance bière/chips, mais aussi Hamid, Annie, Morwena, Isabelle et Claire

Merci à notre mini équipe parkinsonienne du moment : François, je n'oublierai jamais notre croisière tu sais, elle est gravé en moi, merci aussi pour les discussions fructueuses autour du foot, de la NBA, de la NFL, de GoT et j'en passe ; Fiona, l'italo-allemande spécialiste de la culture à grande échelle de fibroblastes, Sidi le nouveau « super-papa » mais aussi nos stagiaires de luxe, Emeline et Amélie. Spéciale dédicace à toi, Emeline, ma super M2. Tu auras été une très très belle rencontre aussi bien professionnellement que personnellement. Vraiment. Et je suis plus qu'heureux que ce soit toi qui prennes la suite de mon projet. Déchire tout !!!

Merci à tous les ex- actuels- et futurs- minions du labo que je n'ai pas encore mentionné : Marie dit Mérou, Val-la rousse, JuL, Clairou, Clairette, Laure, JB, MB ma collègue d'écriture de thèse – on souffre ensemble, mais on y arrivera ensemble -, Raphael l'escaladeur – enfin je sais pas si je dois te remercier toi ; c'est qui ce français qui supporte l'Islande lorsqu'elle joue contre la France ? -, Martinella, Clémence, Vincent, Matthieu, Marc, Lyse ma voisine de région d'origine et de

quartier, Priscinelle, Civia, Typhaine dit wikilab – ca aurait vraiment pas été pareil sans toi -, Agnès, Charlotte, Théo, Sara, Liena, Christelle, Tic & Tac, Marloux, Pingu, Céline, Mathoux, Oriane, Thomas et j'en oublie surement. Merci également à A D E L I N E. Sans toi on n'aurait jamais connu « la bonne humeur ».

Tout n'aurait cependant pas été pareil sans mes trois collègues, amis, BFF, composant le noyau dur comme on le dit si bien. Merci à toi Marie, ma jumelle de thèse, la meilleure super bioinformatico-généticienne. Tu comptes beaucoup pour moi. Merci d'avoir été présente tout au long de ces 1428 jours – et il en reste encore pas mal, prépare toi à me supporter -. Merci Juliano mon voisin de dos, merci d'être la pour discuter autour d'un bon FIFA. Merci à Val, LA vraie et seule généticienne de l'équipe Parkinson. 28 ans un jour, 28 ans toujours. Merci à vous trois. Ces années n'auraient vraiment pas été les mêmes sans vous. Notre route va se séparer, mais c'est pour mieux se rejoindre.

Je voudrais également remercier mes amis de toujours, Greg, Lee, Alex, Jérémy. Vous n'êtes pas dans le domaine des sciences et pensez surement que je fais parti d'une secte, mais ça fait toujours un bien fou de passer du temps avec vous. Merci à Charlotte, Felix et Emeline. Vous, vous savez ce que c'est la thèse, et savez à quel point il faut être passionné pour se lancer dans une telle aventure. Elle n'aurait pas été la même sans vous.

Mais la thèse n'est pas qu'une épreuve scientifique. Elle l'est aussi moralement et psychologiquement. Un énorme merci à mon entourage parfait de m'avoir soutenu à 3000% malgré la distance pour certain et mes horaires pour d'autre. Merci à vous, Maman et Papa, merci de m'avoir soutenu dans mes choix qui m'ont mené jusqu'ici, et probablement encore beaucoup plus loin. J'imagine que c'était difficile pour vous de me voir partir, mais sachez que ça l'était également pour moi. C'est la vie, et tous les choix ne sont pas évidents. Merci à ma fratrie, Etienne – on se voit souvent, mais probablement pas encore assez -, les grumeaux Lou & Lu - ça fait longtemps que je suis parti mais sachez je pense tous les jours à vous-. Merci à mes grands mères, merci à mes grands pères aussi, même si vous n'êtes plus de ce monde. Merci à ma famille en général, et à ma belle famille aussi - je pense en particulier à vous Elisabeth -. Vous êtes tous géniaux.

Et je ne peux terminer ce paragraphe sans remercier la meilleure, sans qui je ne serais pas vraiment pas ici. Merci à toi Emma, merci de m'avoir motivé à bosser, à venir à Paris mais aussi à me lancer dans cette aventure, ce qui n'était pas gagné d'avance. Merci d'être à mes cotés et de partager tout ceci avec moi. Cette thèse est en grande partie la tienne. Tu m'es inestimable.

Un énorme merci à vous tous.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire.....	4
Liste des figures, tableaux et annexes	7
Principales abréviations utilisées	8
Chapitre 1 : Introduction	9
I. La maladie de Parkinson.....	10
1. Physiopathologie et bases génétiques de la maladie de Parkinson	10
a. Généralité / Historique.....	10
b. Symptômes.....	10
c. Neurobiologie de la maladie de Parkinson	11
d. Pourquoi les neurones dopaminergiques meurent-ils prématurément ?	14
e. Les traitements : des alternatives à la L-Dopa ?	16
2. Etiologie de la maladie de Parkinson	18
a. Une maladie infectieuse ?	18
b. Environnement et maladie de Parkinson	18
c. L'hypothèse mitochondriale	20
d. Une cause génétique ?.....	21
3. Une ou plusieurs formes de maladie de Parkinson ? Les formes sporadiques vs les formes monogéniques	21
a. L'apport de la génétique pour identifier des mécanismes défectueux.....	21
b. Les formes monogéniques de la maladie de Parkinson	21
c. Les principales formes autosomiques dominantes	23
d. Les principales formes autosomiques récessives	27
4. Conclusion	31
II. La mitochondrie : à la croisée du métabolisme énergétique, de la signalisation et de la mort cellulaire	31
1. Généralités.....	31
2. Un générateur électrique : la respiration cellulaire	32
3. La dynamique mitochondriale et le transport	33
a. La fusion mitochondriale.....	33
b. La fission mitochondriale	34
c. Le transport.....	34
4. L'import mitochondrial	34
a. La voie d'import classique des pré-protéines	36
b. La voie d'import des protéines polytopiques hydrophobes adressées aux membranes.....	36
5. Import <i>versus</i> réponse au stress mitochondrial : l'UPR ^{mt}	37
6. Import <i>versus</i> mort cellulaire : l'activation du système protéasomal	40
7. <i>Turn-over</i> des mitochondries	40
a. Entre dégradation... ..	40
b. ...et néo-synthèse	43
c. Balance entre biogenèse et mitophagie	44
III. PINK1 et Parkine : les anges gardiens des mitochondries	45
1. L'origine.....	45
2. PINK1, Parkine, dynamique et transport mitochondrial	46
3. Le contrôle de la qualité mitochondriale.....	49

a. L'origine	49
b. Détection des mitochondries endommagées par PINK1	49
c. PINK1 phosphoryle la Parkine	50
d. L'ubiquitine phosphorylée active la Parkine et modifie sa localisation	52
e. Quatre mécanismes impliqués dans le paradigme du contrôle de la qualité mitochondriale	54
4. La biogenèse mitochondriale	58
IV. Remarques et conclusions.....	60
1. Biogenèse <i>versus</i> import mitochondrial	60
2. PINK1, Parkine, mitophagie : qu'en est-il dans les neurones ?	60
3. Conclusion	61
Chapitre 2 : Préface et objectifs	63
Préface	63
Axe I. PINK1, Parkine et la machinerie d'import TOM	64
Axe II. Clairance mitochondriale : entre régulation et couplage	64
Chapitre 3 : Matériel et méthodes supplémentaires	65
Chapitre 4 : Résultats	70
I.1. La machinerie TOM et la mitophagie Parkine-dépendante	71
I.2. La Parkine contrôle l'adressage mitochondrial de son substrat, l'enzyme HSD17 β 10	100
I.3. La Parkine contrôle l'import mitochondrial des protéines à pré-séquences	130
II.1 VPS13C : un nouveau gène impliqué dans les formes autosomiques récessives, dont la perte de fonction affecte la mitochondrie	170
II.2. Réponse au stress mitochondrial dans les neurones : rôle des protéines PINK1 et Parkine	194
Chapitre 5 : Discussion	206
I. La machinerie TOM, un acteur central dans le contrôle de la qualité mitochondriale ?	207
1. Rôle de TOM dans la stabilisation de PINK1	207
2. Rôle de TOM dans la mitophagie.....	210
II. La Parkine protège-t-elle la mitochondrie à travers son interaction avec l'enzyme mitochondriale HSD17 β 10 ?	210
1. HSD17 β 10, une enzyme mitochondriale multifonctionnelle protectrice	210
2. Parkine <i>versus</i> HSD17 β 10	211
3. HSD17 β 10 protège la cellule à travers son rôle dans l'hyperfusion mitochondriale	212
III. L'import mitochondrial : une nouvelle voie de contrôle qualité mis en jeu par la Parkine ?	213
1. Développement d'un biosenseur de l'import mitochondrial.....	213
2. La Parkine facilite l'import mitochondrial des protéines à signal d'adressage N-terminal.....	213
3. Les défauts d'import dans les maladies neurodégénératives	215
4. Régulation spatio-temporelle de la traduction et de l'import des protéines mitochondriales	216
IV. La mitophagie n'est qu'un élément de la réponse mis en œuvre par la cellule lors d'un stress mitochondrial	217
1. Un traitement au CCCP induit une mitophagie dépendante de Parkine dans les neurones.....	217

2. Parkine et biogenèse mitochondriale	218
3. Les autres réponses mises en place par la cellule lors d'un stress mitochondrial et contrôlées par la Parkine	220
4. Rôle de la Parkine au-delà de la mitochondrie	221
V. La mitophagie a-t-elle lieu dans des conditions physiologiques ?	221
1. Parkine et mitophagie : au delà du CCCP	221
2. Importance <i>in vivo</i> des mécanismes de contrôle de la qualité mitochondriale	223
Chapitre 6 : Conclusion.....	225
Bibliographie	227

Liste des figures, tableaux et annexes

Figure 1 Le circuit des ganglions de la base	12
Figure 2 Propagation prion- <i>like</i> des corps de Lewy	13
Figure 3 Les neurotoxines qui affectent les neurones dopaminergiques mettent en jeu des dysfonctions mitochondriales.....	19
Figure 4 Proportion des gènes dont les mutations sont à l'origine des deux types de formes familiales de la maladie de Parkinson	23
Figure 5 Schéma du mécanisme d'agrégation de l' α -synucléine	24
Figure 6 La dynamique mitochondriale	33
Figure 7 Les deux voies classiques d'import mitochondrial	35
Figure 8 L'UPR ^{ER} dans les cellules de mammifères.....	38
Figure 9 L'UPR ^{mt} chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
Figure 10 Voies de signalisation régulant l'autophagie	42
Figure 11 Rôle de PGC-1 α dans la coordination de l'expression de la biogenèse mitochondriale dans les cellules de mammifères.....	44
Figure 12 Représentation schématique de la balance fusion/fission et des conséquences de son déséquilibre	48
Figure 13 Représentation structurale de la Parkine	51
Figure 14 La phosphorylation de l'ubiquitine est essentielle afin de permettre les événements d'ubiquitylation nécessaires à la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles	54
Figure 15 Les quatre voies du contrôle de la qualité mitochondriale.....	54
Figure 16 La clairance des mitochondries endommagées et dépolarisées par mitophagie est régulée par les deubiquitylases USP8, USP15 et USP30.....	58
Figure 17 L'axe Parkine-PARIS contrôle la biogenèse mitochondriale	59
Figure 18 Technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur	67
Tableau 1 Récapitulatif des <i>loci</i> , gènes et protéines associés à la maladie de Parkinson, avec leur mode de transmission.....	22
Tableau 2 Résumé des défauts fonctionnels dus aux différentes mutations du gène <i>PARK2</i> retrouvés chez des sujets atteints de maladie de Parkinson.....	29
Annexe 1 Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives.....	204
Annexe 2 Réponse au CCCP par RT-PCR quantitative	205

Principales abréviations utilisées

$\Delta\Psi^{\text{mit}}$ Potentiel de membrane mitochondrial

CCCP *Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone*

L-Dopa Levodopa

MME Membrane Mitochondriale Externe

MMI Membrane Mitochondriale Interne

MPP *Mitochondrial Processing Peptidase*

mt Mitochondrial

MTS *Mitochondrial Targeting Sequence*

RE Réticulum Endoplasmique

TIM *Translocase of the Inner mitochondrial Membrane*

TOM *Translocase of the Outer mitochondrial Membrane*

UBL *Ubiquitin-like*

UPR *Unfolded Protein Response*

Chapitre 1 : Introduction

I. La maladie de Parkinson

1. Physiopathologie et bases génétiques de la maladie de Parkinson

a. Généralité / Historique

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative fréquente affectant environ 1% des personnes de plus de 60 ans et 4% des plus de 80 ans [Nussbaum *et al.*, 2003]. Rarissime avant 45 ans, elle touche en France entre 100 000 et 120 000 personnes, avec un âge moyen d'apparition de 70 ans. L'incidence de la maladie est de 8-10 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes dans les pays développés et ce chiffre tend à augmenter compte tenu du vieillissement de la population [Bower *et al.*, 1999 ; de Rijk *et al.*, 1995].

La maladie a été décrite pour la première fois en 1817 par le médecin britannique James Parkinson, en tant que « paralysie agitante » [Parkinson, 2002]. C'est le neurologue français Jean-Martin Charcot qui propose le nom de maladie de Parkinson en 1872. De nombreuses personnalités célèbres sont atteintes de la pathologie : c'est entre autres le cas du boxeur Mohamed Ali, des acteurs Michael J. Fox ou Robin Williams, du peintre Salvator Dali ou des dictateurs Adolf Hitler, Francisco Franco ou encore Mao Ze Dong.

b. Symptômes

Le début de la maladie est lent et insidieux : réduction d'activité, fatigue plus importante, raideurs fluctuantes... C'est pourquoi il est difficile d'en poser le diagnostic rapidement. Les signes se précisent ensuite progressivement. Ils sont caractérisés par une triade de symptômes moteurs constituée d'un tremblement de repos, d'une akinésie (lenteur à initier le mouvement) et d'une hypertonie de type extrapyramidal (rigidité musculaire touchant notamment les membres et le rachis) [Kalia *et al.*, 2015].

Comme dans toute maladie neurodégénérative, les lésions s'étendent et lentement, les symptômes s'accroissent. La dépression est également fréquente : 50% des patients atteints de maladie de Parkinson en souffrent. Des troubles de l'attention et de la mémoire sont également constatés dans 20 à 30% des cas et rappellent ceux causés par la maladie d'Alzheimer [Kalia *et al.*, 2015]. En dehors du fait que la pathologie varie beaucoup d'un individu à l'autre, de nombreux facteurs peuvent l'accroître ou, à l'inverse, améliorer ses symptômes. L'émotion, le stress, le sommeil ou la motivation peuvent être ces facteurs.

c. Neurobiologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson s'explique par une dégénérescence progressive, et massive, des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire (SNpc), un noyau profond du système nerveux central situé au niveau du mésencéphale. Les neurones la composant affèrent vers le striatum, et plus précisément vers le noyau caudé et le *putamen*, permettant une libération de dopamine à ces structures. Il s'agit donc d'une région essentielle à la motricité [Conn *et al.*, 2005] (**Figure 1**). La dopamine est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines, et elle est synthétisée dans les neurones à partir de la tyrosine d'origine circulante. Cette réaction est assurée par deux enzymes : la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse de la dopamine contrôlant la production de L-Dopa *via* l'utilisation du cofacteur BH₄ (*tetrahydrobiopterin*), et la Dopa-décarboxylase (DDC) assurant la décarboxylation de la L-Dopa pour donner de la dopamine [Goldstein *et al.*, 1992].

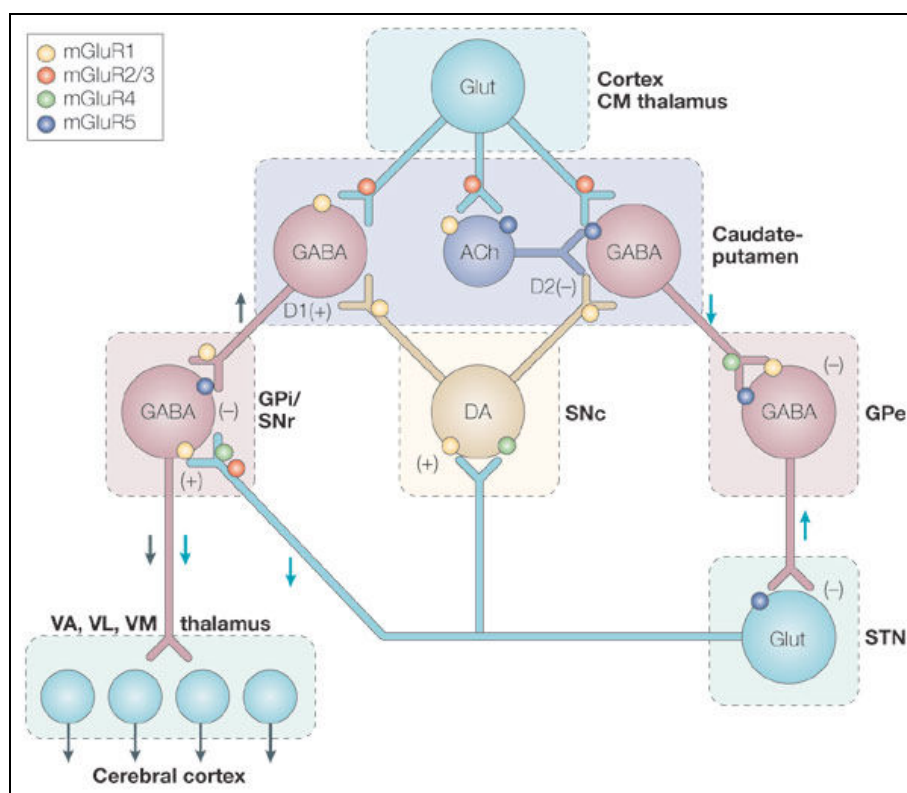


Figure 1 Le circuit des ganglions de la base

Voie de signalisation montrant comment la dopamine influence l'activité des voies directe et indirecte, deux voies régulant l'activité des neurones thalamo-corticaux. L'activation des récepteurs D1 stimule les neurones de la voie directe, conduisant à l'inhibition des récepteurs des neurones GABA dans le GPi (*Glubus Pallidus Interne*) et la SNr (*Substance Noire pars reticulata*). Pour la voie indirecte, l'activation des récepteurs D2 inhibe les neurones dont les projections sont dirigées vers le GPe (*Glubus Pallidus Externe*). Ceci résulte en l'inhibition séquentielle des neurones glutamatergiques du STN (noyau sub-thalamique) et des neurones GABA de la GPi/SNr. D'après [Conn *et al.*, 2005].

L'étude anatomo-pathologique de cerveaux de patients parkinsoniens a objectivé la présence de corps de Lewy dans certains neurones de la SN_{pc} ou du cortex, des inclusions intra-cytoplasmiques arrondies enrichies en α -synucléine, une protéine localisée au niveau des terminaisons pré-synaptiques, mais dont la fonction normale reste mal comprise (**Paragraphe I.3.a.α**). Certaines de ces inclusions contiennent également des neurofilaments, de l'ubiquitine ou des organites intracellulaires telles que les mitochondries [Forno, 1996 ; Spillantini *et al.*, 1998]. Néanmoins, l'origine de ces formations reste encore inconnue : il pourrait s'agir de protéines produites en excès ou mal-repliées. Il a de plus été proposé de manière intéressante que les corps de Lewy pourraient se propager entre différentes structures cérébrales interconnectées à la manière des prions. En effet, en 2008, trois études ont reporté que des neurones mésencéphaliques embryonnaires greffés

dans le striatum de trois patients parkinsoniens sur huit étudiés développaient 11, 14 et 16 ans après l'opération des corps de Lewy [Kordower *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008 ; Mendez *et al.*, 2008].

Ces résultats sont en adéquation avec le modèle proposé au début des années 2000 reposant sur l'idée que l'évolution des pathologies à corps de Lewy ne serait pas aléatoire. En effet, les régions de vulnérabilité aux corps de Lewy dans le cerveau seraient affectées avec une séquence topographique prévisible (**Figure 2**). Ce modèle est basé sur l'idée que les cellules du système nerveux central développant des corps de Lewy partagent des caractéristiques communes. Plus précisément, les neurones avec des axones longs, minces, amyéliniques ou mal myélinisés sont particulièrement sensibles au développement de lésions [Braak *et al.*, 2000 ; Braak *et al.*, 2003]. En accord avec cela, les projections corticales des neurones plus robustes et fortement myélinisés semblent résister à cette pathologie [Braak *et al.*, 2003]. Selon Braak *et al.*, c'est cette vulnérabilité sélective des neurones qui explique la propagation prévisible.

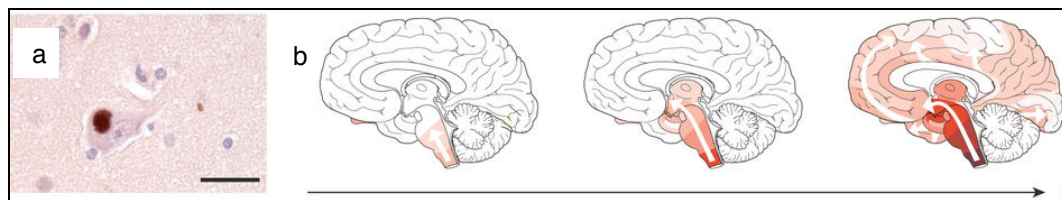


Figure 2 Propagation prion-*like* des corps de Lewy

(a) Un corps de Lewy constitué d' α -synucléine situé dans un neurone du néocortex d'un patient atteint de maladie de Parkinson. (b) Progression caractéristique au cours du temps des corps de Lewy, déduite de l'analyse *post-mortem* de patients atteints de maladie de Parkinson. D'après [Jucker *et al.*, 2013].

A la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc s'associe une dégénérescence d'autres types cellulaires tels que les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, les neurones noradrénergiques du *locus caeruleus*, les neurones cholinergiques du noyau pédonculopontin et du noyau basal de Meynert, et des cellules hypocrétines de l'hypothalamus [Obeso *et al.*, 2010]. Cette dégénérescence joue un rôle important dans la progression de la maladie et pourrait être à l'origine des symptômes non moteurs visibles dans les stades précoces de la maladie de Parkinson. Les symptômes moteurs n'apparaissent quant à eux qu'après

une perte de plus de 80% des neurones dopaminergiques, ce qui laisse à penser que des phénomènes compensatoires importants doivent exister, compliquant ainsi le diagnostic de la maladie [Bernheimer *et al.*, 1973].

d. Pourquoi les neurones dopaminergiques meurent-ils prématurément ?

Même si aucune cause exacte n'a pour l'instant été définie, plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la dégénérescence préférentielle des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson : (1) les neurones dopaminergiques seraient un des types cellulaires les plus sensibles, liant ainsi le métabolisme dopaminergique, la sensibilité aux radicaux libres, et la mort de ces cellules [Calne, 1992] ; (2) le calcium intracellulaire entrainerait dans ces neurones un stress mitochondrial oxydant pouvant devenir progressivement délétère ; (3) des délétions de l'ADN^{mt} ont été observées dans ces neurones, pouvant expliquer leur plus importante fragilité.

Les neurones dopaminergiques sont de façon constitutive exposés à de fortes quantités de radicaux libres oxygénés, des substances hautement réactives et toxiques produites par le métabolisme cellulaire. Ceci est en partie dû au catabolisme de la dopamine, un processus qui s'effectue selon deux grandes voies : (1) la dégradation oxydative, et (2) la dégradation non enzymatique, dite auto-oxydative de la dopamine. La dégradation oxydative utilise en particulier la monoamine oxydase (MAO), une enzyme qui produit du peroxyde d'hydrogène, un précurseur immédiat des radicaux libres [Damier *et al.*, 1996 ; Spina *et al.*, 1989]. La dégradation auto-oxydative conduit quant à elle à la synthèse de neuromélanine, un pigment présent chez l'homme dans de nombreux neurones dopaminergiques de la substance noire et du *locus caeruleus*, et qui produit des radicaux libres. De plus, les neurones dopaminergiques contiennent des mitochondries, et la chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie est elle aussi génératrice de radicaux libres [Obata, 2002]. Enfin, la substance noire est une des régions cérébrales les plus riches en fer. Or, le fer favorise également la formation de radicaux libres [Schafer *et al.*, 2000]. La dysfonction de l'un ou de plusieurs de ces

systemes producteurs de radicaux libres pourrait être la source du stress oxydant, capable de détruire les neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson.

La seconde hypothèse est que la mort des neurones dopaminergiques serait causée par un dysfonctionnement électrique résultant de l'excitotoxicité de ces neurones qui pourrait être dû à une sur-stimulation de leurs récepteurs NMDA au glutamate [Assous *et al.*, 2014]. L'emballement métabolique de ces neurones pourrait également être lié à leur activité *pacemaker* mettant en jeu les canaux calciques voltage-dépendant de type L. Lors d'un dysfonctionnement mitochondrial chez la souris, il a en effet été montré que ces canaux calciques induisaient une augmentation du calcium intracellulaire, ce qui entraînait un stress mitochondrial oxydant pouvant devenir progressivement délétère pour les neurones dopaminergiques [Guzman *et al.*, 2010]. Cette augmentation du calcium cytosolique aurait un effet d'autant plus néfaste que ces neurones ont une faible capacité de tamponnage du calcium intracellulaire [Gaspar *et al.*, 1994]. L'un des arguments en faveur de cette hypothèse est que l'isradipine, un bloqueur spécifique des canaux calciques voltage-dépendant, empêche le stress mitochondrial, induisant une protection de ces neurones dans certains modèles animaux de maladie de Parkinson [Surmeier *et al.*, 2013].

Enfin, des délétions de l'ADN^{mt} ont été observées dans des neurones dopaminergiques de SNpc issues de cerveaux humains post-mortem d'individus âgés et de patients atteints de formes idiopathiques de maladie de Parkinson [Bender *et al.*, 2006 ; Kraytsberg *et al.*, 2006]. Ces observations n'ont pas été retrouvées dans les autres types de neurones, suggérant qu'il pourrait d'agir d'un mécanisme spécifique aux neurones dopaminergiques, expliquant ainsi leur fragilité. Aussi, des mutations de *POLG* (*mitochondrial DNA polymerase gamma*), qui résultent en l'accumulation de multiples délétions de l'ADN^{mt} dans le muscle ont été associées à des syndromes parkinsoniens répondant à la L-Dopa, ainsi qu'à une perte importante de neurones dopaminergiques de la SNpc [Davidzon *et al.*, 2006 ; Luoma *et al.*, 2004].

e. Les traitements : des alternatives à la L-Dopa ?

La prise en charge thérapeutique de la maladie de Parkinson est complexe. Elle associe adaptation des prises des médicaments basée sur les informations recueillies des malades et de leur entourage, gestion de la vie quotidienne et rééducation à tous les stades évolutifs de la maladie. La maladie de Parkinson étant associée à une déplétion en dopamine, les traitements pharmacologiques utilisés permettant de la traiter tentent de pallier cette insuffisance par deux approches ; (1) en administrant un précurseur de la dopamine (la L-Dopa) ou un agoniste de la dopamine ; (2) en ciblant la dégradation de la dopamine, par exemple par l'intermédiaire d'inhibiteurs de la COMT (*Catechol-O-Methyl Transferase*) ou de la MAO (Monoamine oxydase), des enzymes permettant le catabolisme des catécholamines. La L-Dopa reste néanmoins le médicament le plus préconisé car le plus puissant pour l'amélioration des troubles moteurs. Il est cependant symptomatique car il ne soigne pas la maladie, dans le sens où il ne prévient pas la mort neuronale. Il n'est également pas efficace de la même manière chez tous les patients et une part d'entre eux y est résistante, en particulier les patients atteints de syndromes parkinsoniens atypiques. Ils entraînent également à plus ou moins long terme des effets secondaires invalidants chez un grand nombre de patients, et en particulier des dystonies. Egalement, des inhibiteurs de la COMT ou de la MAO peuvent être utilisés seuls en début de maladie ou peuvent être associés à la L-Dopa pour prolonger ses effets. Tout comme la L-Dopa, ces traitements peuvent engendrer des effets secondaires invalidants [Schapira, 2007].

Une approche chirurgicale a également été développée dans le traitement de la maladie de Parkinson, mais aussi des tremblements, des TOC (troubles obsessionnels compulsifs) et des dystonies, depuis la fin des années 1980 par les professeurs Alim-Louis Benabid et Pierre Pollak [Benabid, 2003]. Il s'agit de la stimulation cérébrale profonde, une méthode invasive consistant à implanter dans le thalamus, le noyau sous-thalamique ou le *globus pallidus* des électrodes connectées à un boîtier placé sous la peau délivrant un courant électrique de faible intensité. Ce traitement est proposé aux patients répondants bien à la L-Dopa et ayant des dyskinésies sévères, un tremblement résistant aux médicaments et des fonctions

cognitives relativement conservées [Okun, 2012]. C'est devenu une approche thérapeutique de plus en plus utilisée en France. Tout comme les thérapeutiques médicamenteuses, cette stimulation ne soigne pas la maladie mais ne fait qu'améliorer les signes moteurs et ainsi la qualité de vie des patients résistant au traitement habituel [Okun, 2012]. L'efficacité semble être prolongée, avec un recul de plus de 10 ans pour certains patients [Castrìoto *et al.*, 2011]. Cette technique présente néanmoins des risques, notamment celui de saignement pendant l'opération, et/ou des effets secondaires après l'implantation comme une confusion mentale transitoire, une apathie ou des troubles de la parole qui peuvent être durables [Okun, 2012].

De nombreuses recherches aboutissent également au développement de concepts thérapeutiques nouveaux dans la maladie de Parkinson. Tout d'abord, il existe des modificateurs d'autres systèmes chimiques que la dopamine et nous pouvons citer des agents agissant sur le glutamate, la sérotonine, l'acétylcholine, l'adénosine. Des effets neuroprotecteurs de la nicotine ont également été mis en évidence dans des modèles de rats et de souris de maladie de Parkinson [Huang *et al.*, 2009 ; Parain *et al.*, 2003 ; Visanji *et al.*, 2006], et des recherches sont en cours chez l'Homme pour déterminer si un traitement par la nicotine peut améliorer les signes moteurs, en protégeant les neurones dopaminergiques et ainsi ralentir l'évolution de la maladie. Des premiers essais cliniques sur des patients traités à la nicotine n'ont malheureusement pas été concluants [Hanagasi *et al.*, 2007 ; Lemay *et al.*, 2004 ; Mitsuoka *et al.*, 2002 ; Villafane *et al.*, 2007]. Néanmoins, on peut imaginer que cette intervention est peut être trop tardive, car les patients présentant les symptômes cliniques de la maladie ont déjà une perte neuronale importante rendant le traitement pharmacologique peu efficace.

Nous pouvons ainsi conclure que les traitements existants, bien qu'efficaces, ne permettent pas d'endiguer, ni même de ralentir l'évolution de la maladie de Parkinson. Les mécanismes fondamentaux à l'origine de la dégénérescence des neurones de la SNpc restent ainsi à être mieux explorés et caractérisés, afin de permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes et efficaces.

2. Etiologie de la maladie de Parkinson

Les causes exactes restent aujourd'hui inconnues. Plusieurs hypothèses ont cependant été avancées depuis la découverte de la maladie.

a. Une maladie infectieuse ?

Peu après la découverte de la pathologie, des chercheurs ont proposé qu'elle pourrait être d'origine virale. En effet, une épidémie d'encéphalite léthargique, une forme rare d'encéphalite virale, a sévi dans le monde entre 1915 et 1926 [Reid *et al.*, 2001]. Cette infection est connue pour laisser chez certains patients des séquelles neurologiques invalidantes et définitives, dont un syndrome parkinsonien post-encéphalique (PEP), très akinétique, si bien que les victimes ont l'apparence de statues, privées de parole et de mouvements, et présentent une dégénérescence des cellules de la substance noire [Dale *et al.*, 2004]. Ce syndrome n'était cependant pas pur, les patients souffrant également de dystonies, d'épisodes délirants, et parfois de troubles démentiels.

Le virus n'a cependant jamais été identifié mais cela démontre qu'un microbe peut atteindre le cerveau et détruire des régions spécifiques telle que la SNpc. Cette hypothèse mettant en cause une maladie virale ou bactérienne est actuellement abandonnée [Goldsmith *et al.*, 1997].

b. Environnement et maladie de Parkinson

Depuis longtemps, les pesticides et toxines ont été considérés comme des agents prédisposant à l'apparition de la maladie de Parkinson : (1) en 1976, Barry Kidson, un étudiant en chimie du Maryland, s'est injecté par erreur du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), une neurotoxine qui lorsqu'elle est métabolisée en MPP⁺, va être importée par le transporteur de la dopamine et détruire spécifiquement les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale, et ainsi provoquer des symptômes de la maladie de Parkinson [Langston *et al.*, 1983] ; (2) l'administration de pesticides tels que la roténone induit également chez l'homme une perte de neurones dopaminergiques,

associée à la production de corps de Lewy et à un phénotype de bradykinésie et de rigidité chez la souris [Betarbet *et al.*, 2000]. A l'inverse du MPTP, ce pesticide n'est pas spécifique des neurones dopaminergiques car il n'est pas importé dans la cellule par le transporteur de la dopamine. Le paraquat, un des herbicides les plus utilisés au monde, induit également un déficit moteur pouvant être relié à un syndrome parkinsonien chez la souris, et à une dégénérescence des neurones dopaminergiques dépendant de la dose utilisée et de l'âge des animaux [Tieu, 2011]. Le paraquat est également la drogue la plus utilisée chez la drosophile pour induire un modèle de maladie de Parkinson, associée également à une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques [Cassar *et al.*, 2015].

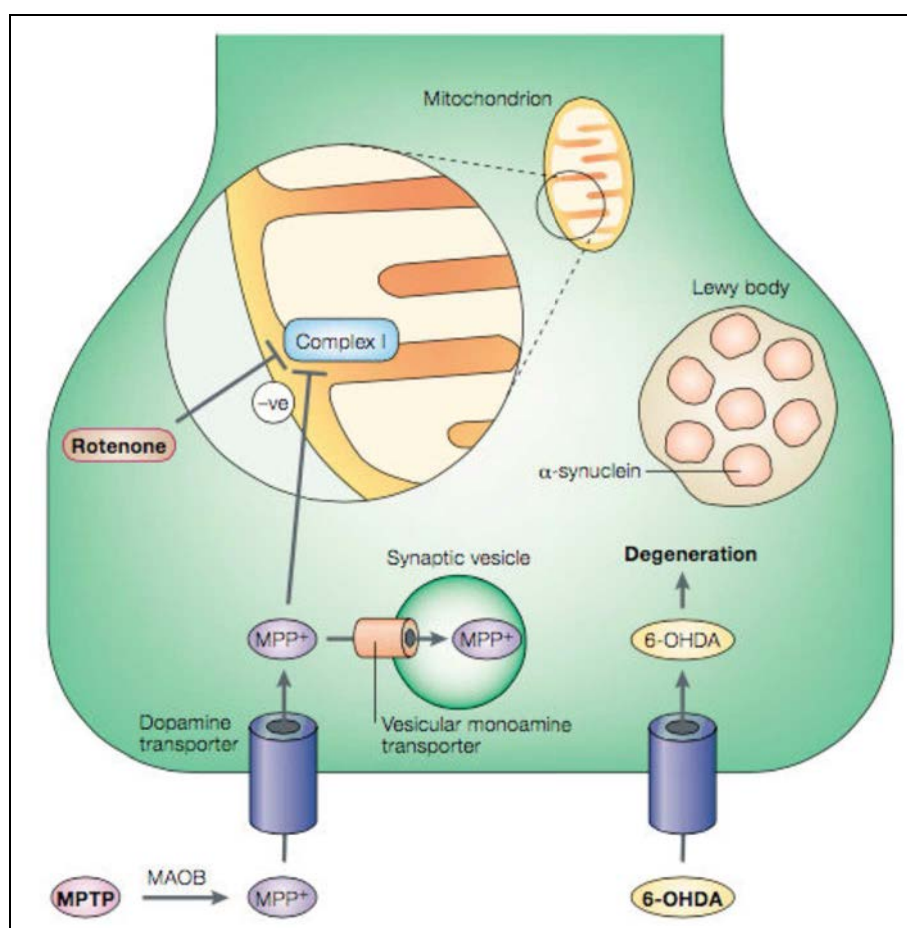


Figure 3 Les neurotoxines qui affectent les neurones dopaminergiques mettent en jeu des dysfonctions mitochondriales

Le MPTP est converti par la MAOB (monoamine oxydase B) en MPP⁺. Le MPP⁺ est récupéré par le transporteur de la dopamine et s'accumule dans la mitochondrie conduisant à une inhibition du complexe I et à la génération de radicaux libres ; il peut également être récupéré par les transporteurs vésiculaires des monoamines, ce qui réduit sa toxicité. La roténone est un inhibiteur direct de complexe I, ce qui conduit à la formation de radicaux libres. D'après [Beal, 2001].

c. L'hypothèse mitochondriale

En 2003, Shimizu *et al.* ont montré que comme pour le MPP⁺, la roténone agit sur le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 3**) [Chance *et al.*, 1963 ; Nicklas *et al.*, 1985 ; Ramsay *et al.*, 1986 ; Shimizu *et al.*, 2003]. Les conséquences de ces deux drogues sont sévères : réduction de l'activité de l'ATP synthase, un complexe protéique permettant de synthétiser l'ATP (adénosine triphosphate) à partir du gradient électrochimique de protons entretenu par la chaîne respiratoire et d'ADP, ainsi que de phosphate inorganique (Pi) ; production de radicaux libres et stress oxydant ; inhibition de l'activité protéasomale ; génération de stress mitochondrial par accumulation de protéines mal conformées ; et mort de la cellule par apoptose [Ramachandiran *et al.*, 2007]. L'ensemble de ces perturbations soutient une hypothèse mitochondriale majeure dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Ces observations sont de plus soutenues par le fait que des altérations de l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été identifiées chez des patients parkinsoniens sporadiques [Haas *et al.*, 1995 ; Mann *et al.*, 1994 ; Schapira *et al.*, 1989]. Des mutations somatiques de l'ADN^{mt} s'accumulent également chez les patients parkinsoniens idiopathiques âgés, mais pas chez des contrôles appariés [Simon *et al.*, 2004]. Il a aussi été montré que le nombre de délétion de l'ADN^{mt} serait plus important dans les neurones dopaminergiques de patients parkinsoniens en comparaison avec des sujets sains du même âge. Ces accumulations n'ont pas été observées dans les neurones hippocampiques, les neurones pyramidaux du cortex ou dans les cellules de Purkinje du cervelet d'individus âgés, ce qui indique qu'il s'agirait d'un processus spécifique des neurones dopaminergiques [Bender *et al.*, 2006 ; Kraytsberg *et al.*, 2006]. De plus, une étude récente montre pour la première fois que des mutations ponctuelles de l'ADN^{mt} peuvent être retrouvées chez des patients atteints de maladie de Parkinson sporadique juvénile [Lin *et al.*, 2012].

Bien qu'on ne comprenne encore pas son implication directe, ces différentes études suggèrent que le stress mitochondrial pourrait être un facteur de risque primaire dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques et donc dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

d. Une cause génétique ?

La maladie de Parkinson a longtemps été considérée comme l'archétype des maladies non génétiques, en partie du fait de causes environnementales démontrées. De plus, les premières études dans les années 90 sur des jumeaux manquaient de concordance [Tanner *et al.*, 1999]. Néanmoins, des formes familiales de maladie de Parkinson avec des mutations monogéniques causales ségrégant avec la maladie ont depuis été identifiées, confirmant l'existence d'une susceptibilité génétique à la maladie de Parkinson.

3. Une ou plusieurs formes de maladie de Parkinson ? Les formes sporadiques vs les formes monogéniques

a. L'apport de la génétique pour identifier des mécanismes défectueux

Bien que la grande majorité des formes de maladies de Parkinson soit sporadique, 5 à 10% d'entre elles sont d'origine génétique et sont dues à des mutations monogéniques [Corti *et al.*, 2011]. Différents gènes ont été identifiés ces vingt dernières années, comme c'est le cas pour *SNCA*, le premier d'entre eux, qui code pour l' α -synucléine [Polymeropoulos *et al.*, 1997]. Les mutations dans ces gènes sont responsables de formes familiales de maladie de Parkinson, transmises selon les modes autosomiques récessif ou dominant. L'étude de ces gènes a permis et permet toujours de découvrir des processus biologiques, mais aussi des voies moléculaires altérées dans ces formes familiales, et possiblement dans les formes sporadiques de la pathologie [Ryan *et al.*, 2015]. Les principaux défauts semblent impliquer le système ubiquitine-protéasome, le processus de dégradation des mitochondries par le système autophagie-lysosome, ainsi que l'agrégation protéique.

b. Les formes monogéniques de la maladie de Parkinson

Les différents gènes impliqués ont été identifiés par différentes approches génétiques. Les premiers *loci* ont été mis en évidence par analyse de liaison, puis les mutations ont été identifiées par séquençage classique, et enfin par l'arrivée du séquençage de nouvelle génération. Ces études, notamment dans les grandes

familles de patients avec un syndrome parkinsonien, ont permis d'identifier au moins 18 *loci* et 15 gènes associés à des formes autosomiques dominantes et récessives [Hernandez *et al.*, 2016 ; Lesage *et al.*, 2016] (**Tableau 1**). Cependant, les mutations de ces gènes expliquent moins de 50% des formes génétiques de la maladie (**Figure 4**).

Loci	Gène	Position	Protéine	Modèle
PARK1/4	<i>SNCA</i>	4q21	α -synucléine	Dominant
PARK2	<i>PARK2</i>	6q25-q27	E3 ubiquitin-protein ligase parkin	Récessif
PARK3	Inconnu	2p13	Inconnue	Dominant
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Dominant
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35-p36	Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	Récessif
PARK7	<i>PARK7</i>	1p36	Protein deglycase DJ-1	Récessif
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	Dominant
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	Probable cation-transporting ATPase 13A2	Récessif
PARK10	Inconnu	1p32	Inconnue	Facteur de risque
PARK11	<i>GIGYF2</i>	2q36-q37	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	Dominant
PARK12	Inconnu	Xq21-q25	Inconnue	Lié à l'X
PARK13	<i>HTRA2</i>	2p13	Serine protease HTRA2, mitochondrial	Dominant
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q12-q13	85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2	Récessif
PARK15	<i>FBXO7</i>	22q12-q13	F-box only protein 7	Récessif
PARK17	<i>VPS35</i>	16q11	Vacuolar protein sorting-associated protein 3	Dominant
PARK18	<i>EIF4G1</i>	3q27	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Dominant
PARK19	<i>DNAJC6</i>	1p31	DnaJ homolog subfamily C member 16	Récessif
PARK23	<i>VPS13C</i>	15q22	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Récessif
-	<i>SNCA</i>	4q21	α -synucléine	Facteur de risque
-	<i>LRRK2</i>	12q12	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	Facteur de risque
-	<i>GBA</i>	1q21	Glucosylceramidase	Facteur de risque

Tableau 1 Récapitulatif des *loci*, gènes et protéines associés à la maladie de Parkinson, avec leur mode de transmission

Adapté de [Corti *et al.*, 2011 ; Hernandez *et al.*, 2016 ; Lesage *et al.*, 2016].

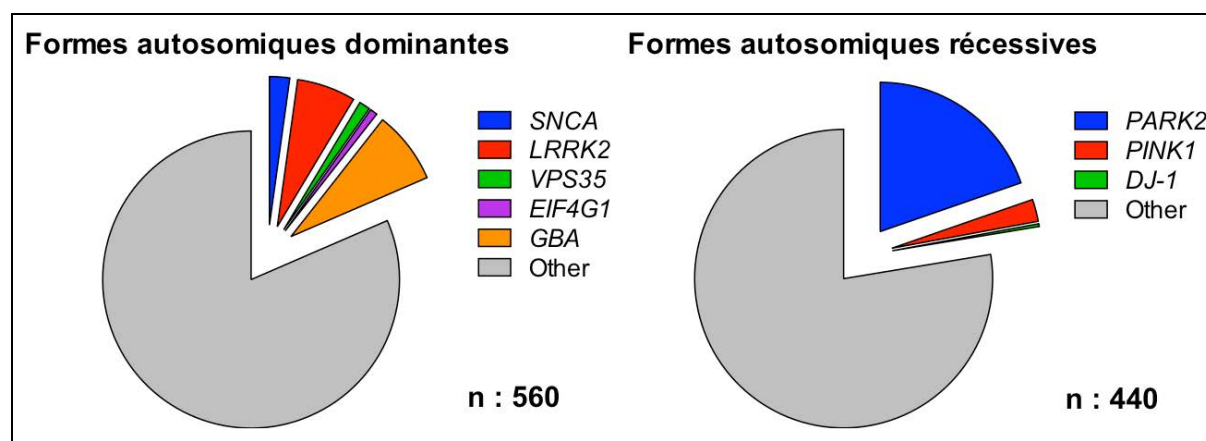


Figure 4 Proportion des gènes dont les mutations sont à l'origine des deux types de formes familiales de la maladie de Parkinson

(Données acquises par Suzanne Lesage à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris en 2015)

c. Les principales formes autosomiques dominantes

a. SNCA (PARK1 et PARK4)

L' α -synucléine, codée par le gène *SNCA* est le constituant majeur des corps de Lewy. Deux catégories de mutations ont été décrites depuis la découverte de la première mutation (A53T) dans une famille italienne en 1997 [Polymeropoulos *et al.*, 1997] : (1) des mutations ponctuelles conduisant à des variations faux-sens de la protéine, et (2) des multiplications du locus entier, incluant duplication et triplication induisant dans tous les cas une surexpression de la protéine. Bien qu'étant les premières décrites, les mutations ponctuelles sont beaucoup plus rares, et peu de familles présentent ces mutations. Seuls six variants ont en effet été décrits : A53T, A30P, E46K, G51D, H50Q, A53E [Dehay *et al.*, 2015].

La question de sa toxicité sélective pour les neurones dopaminergiques et ainsi dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson n'est toujours pas élucidée mais elle pourrait être due à la fois à une perte de fonction (séquestration de l' α -synucléine dans des agrégats), et à un gain de fonction toxique (polymérisation de cette protéine sous forme oligomérisée ou fibrillaire) (**Figure 5**).

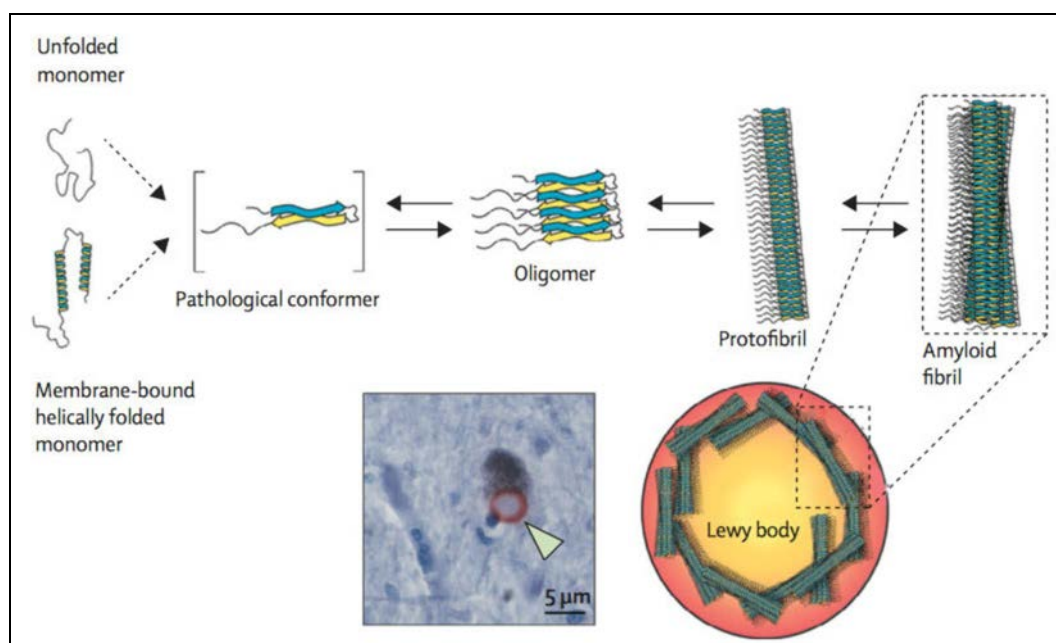


Figure 5 Schéma du mécanisme d'agrégation de l'α-synucléine

L'α-synucléine existe sous différentes conformations et possède au moins deux isoformes structurales : une forme monomérique mal repliée et une forme monomérique liée aux membranes et riche en hélices. Les deux isoformes peuvent subir des modifications structurales importantes, entraînant la formation de structures riches en feuillet-β. L'α-synucléine serait en équilibre dynamique, où les monomères pourraient premièrement s'agréger en différents types de petites espèces oligomériques qui seraient stabilisées par des interactions en feuillet-β, puis en protofibrilles insolubles de hauts poids moléculaires qui se polymériseraient en fibrilles amyloïdes semblables à celle identifiées dans les corps de Lewy. Adapté de [Dehay *et al.*, 2015].

L'α-synucléine est une protéine retrouvée majoritairement dans les tissus nerveux [Iwai *et al.*, 1995], dont le néocortex, la substance noire et le thalamus [Yu *et al.*, 2007]. Elle a été originellement mise en évidence dans les terminaisons pré-synaptiques où elle se lie aux membranes [George *et al.*, 1995 ; Maroteaux *et al.*, 1988 ; McLean *et al.*, 2000]. Plus récemment, il a été montré que l'α-synucléine était aussi localisée au niveau des mitochondries dans des neurones du bulbe olfactif, de l'hippocampe, du striatum et de thalamus [Liu *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2008]. La protéine interagit également avec la tubuline [Alim *et al.*, 2002] et est donc retrouvée associée aux microtubules, à l'image de la protéine Tau [Alim *et al.*, 2004]. Dans les neurones dopaminergiques, hippocampiques et mésencéphaliques en culture, la surexpression de la protéine humaine sauvage à des niveaux non-toxiques provoque une inhibition de l'exocytose de vésicules synaptiques [Nemani *et al.*, 2010].

L' α -synucléine est physiologiquement une protéine soluble, non structurée, résistant à l'agrégation [Bartels *et al.*, 2011 ; Dettmer *et al.*, 2013 ; Westphal *et al.*, 2013]. Cependant, mutée, elle s'agrège pour former des fibrilles insolubles comme c'est le cas dans la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy ou l'atrophie multi-systématisée, des pathologies connues sous le nom de synucléinopathies, ce qui lui confère un effet toxique par gain de fonction [Mezey *et al.*, 1998 ; Spillantini *et al.*, 1998].

β . LRRK2 (PARK8)

Découvert initialement en 2004, les mutations retrouvées sur le gène *LRRK2* sont les plus importantes en termes de prévalence pour les formes autosomiques dominantes de maladie de Parkinson [Paisan-Ruiz *et al.*, 2004] (**Figure 4**). Il s'agit de formes de maladie de Parkinson moins précoces, répondants très bien au traitement par la L-Dopa. De multiples mutations de *LRRK2* ont été identifiées, incluant les mutations I2020T, G2019S, R1441G, R1441C et T1699C [Funayama *et al.*, 2002 ; Glick *et al.*, 1992 ; Ishihara *et al.*, 2006 ; Mata *et al.*, 2005 ; Munhoz *et al.*, 2008 ; Paisan-Ruiz *et al.*, 2004]. La mutation G2019S située sur le domaine kinase de *LRRK2* est la plus fréquente et elle induit une augmentation de son activité kinase [Correia Guedes *et al.*, 2010]. Elle est cependant toxique lorsqu'elle est surexprimée dans des neurones en culture [Greggio *et al.*, 2006 ; Smith *et al.*, 2006].

De nombreuses études récentes *in vitro* ont permis d'identifier différents rôles de *LRRK2*. En effet, un lien entre cette kinase et la régulation de l'autophagie a émergé ces dernières années ; en particulier, la surexpression de mutants pathogéniques de *LRRK2*, qui induit une accumulation d'autophagosome dans de multiples types cellulaires, incluant les neurones [Cherra *et al.*, 2013] et les lignées cellulaires neuronales [Plowey *et al.*, 2008]. Il a également été montré que *LRRK2* est co-localisée avec la β -tubuline [Biskup *et al.*, 2006 ; Gloeckner *et al.*, 2006] et interagit directement avec l' α et la β -tubuline de par son domaine GTPase [Biskup *et al.*, 2006 ; Gandhi *et al.*, 2008]. Cependant, la β -tubuline phosphorylée n'est pas immunoprécipitée avec *LRRK2*, malgré leur interaction. Lorsqu'elle est incubée avec un milieu riche en protéines associées aux microtubules (MAP, *microtubule*

associated proteins), le mutant G2019S de LRRK2 augmente significativement l'assemblage et la stabilité des microtubules, ce qui suggère que l'augmentation de la phosphorylation de la β -tubuline par le mutant G2019S résulte en une diminution de la dynamique des microtubules, affectant ainsi la structure des neurones [Gillardon, 2009]. Il existe également de nombreuses évidences suggérant qu'une activité trop faible, ou trop élevée de LRRK2 contribue à un raccourcissement des neurites, bien que certaines études plus anciennes indiquent que le *knock-down* de *LRRK2* chez la souris induisent à l'inverse leur élongation [MacLeod *et al.*, 2006]. Il a aussi été proposé que l'augmentation de l'expression de *LRRK2* ou de son activité kinase augmente la traduction de certaines protéines (Moesin, 4E-BP, MBP...) à des niveaux qui déstabilisent la machinerie de dégradation cellulaire, ce qui résulte en l'accumulation de protéines indésirables [Imai *et al.*, 2008 ; Tain *et al.*, 2009].

De plus, une perte du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi^{\text{mit}}$) a été rapportée dans des cultures primaires de neurones corticaux, dans des lignées cellulaires immortalisées et dans des fibroblastes humains issus de patients parkinsoniens, portant des mutations du gène *LRRK2* [Cherra *et al.*, 2013 ; Papkovskaia *et al.*, 2012]. Une augmentation des radicaux libres et une diminution des niveaux d'ATP a aussi été reportée dans des fibroblastes portant la mutation G2019S de *LRRK2* [Mortiboys *et al.*, 2010 ; Su *et al.*, 2013].

Il est enfin connu qu'une diminution du $\Delta\Psi^{\text{mit}}$ initie une fission mitochondriale ou que le *knock-out* de *PINK1* chez la souris empêche la phosphorylation de la protéine pro-fission Drp1 sur sa Ser637, une étape nécessaire à son recrutement à la mitochondrie dans le but permettre la fission de cet organite [Dagda *et al.*, 2009 ; Sandebring *et al.*, 2009]. Deux études récentes suggèrent en accord avec ces observations que la surexpression de LRRK2 ou de ses mutants conduit aussi à une fragmentation mitochondriale dans des neurones corticaux et dans des lignées cellulaires [Niu *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012].

d. Les principales formes autosomiques récessives

a. Parkine (PARK2)

Les mutations du gène *PARK2* codant la protéine Parkine sont la cause la plus fréquente des formes juvéniles autosomiques récessives (âge de début inférieur à 40-50 ans) de maladies de Parkinson. Ces mutations sont à l'origine de 10 à 20% de l'ensemble des formes, dont 40% des formes récessives et environ 15% des cas isolés en Europe. Initialement découvertes au Japon, des mutations du gènes *PARK2* ont aussi été identifiées dans des familles d'origine ethnique différente [Kitada *et al.*, 1998 ; Lucking *et al.*, 2000 ; Periquet *et al.*, 2003]. Cependant, la fréquence des mutations de ce gène diminue significativement lorsque les patients débutent la pathologie plus tardivement. Elles sont à l'origine de 80% des formes autosomiques récessives de maladies de Parkinson chez les patients de moins de 20 ans, et deviennent très rares chez les patients avec un début après 50 ans [Corti *et al.*, 2011]. Les délétions exoniques ont été les premières décrites en 1998 [Kitada *et al.*, 1998]. Les patients présentant des mutations du gène *PARK2* ont une très bonne réponse à la L-Dopa mais développent rapidement des dyskinésies. Plus de 170 mutations ont été décrites, incluant des larges délétions ou multiplications d'exons, des petites indels (insertion/délétion), ainsi que des mutations faux-sens [Nuytemans *et al.*, 2010].

Les patients portant des mutations du gène *PARK2* sont cliniquement très similaires aux patients sporadiques, mais présentent en plus des caractéristiques particulières : en plus d'un début précoce, ils ont plus de dystonies, ainsi qu'une hyper-réflexie. Des signes pyramidaux, des caractéristiques cérébelleuses et des maladies psychiatriques ont également été rapportés. La maladie reste cependant relativement bénigne à son commencement, avec une progression lente et une bonne réponse à de faibles doses de L-Dopa [Corti *et al.*, 2011].

D'un point de vue neuropathologique, les mutations du gène *PARK2* sont associées à une perte massive de neurones dopaminergiques dans la SNpc ainsi qu'à une perte plus modérée de ces neurones au niveau du locus *cœruleus* [Mori *et al.*, 1998], et à des lésions plus restreintes que dans la maladie sporadique. La

dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc est probablement due à une perte de fonction de la Parkine, une protéine pourtant ubiquitaire. D'un point de vue structurel, la protéine Parkine porte un domaine semblable à l'ubiquitine (UBL, *Ubiquitin Like Domain*), suivi de trois domaines RING (*Really Interesting New Gene*) séparés par un domaine IBR C-terminal (*In Between Ring fingers*) [Hristova *et al.*, 2009]. Fonctionnellement, il s'agit d'une E3 ubiquitine-protéine ligase cytosolique, responsable du transfert de molécules d'ubiquitine sur ses substrats, permettant leur dégradation par le protéasome [Imai *et al.*, 2000 ; Shimura *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2000]. Il a ainsi été suggéré que les mutations du gène *PARK2* étaient à l'origine d'une plus mauvaise dégradation de ses substrats, ce qui engendrait leur accumulation et leur agrégation. Plusieurs études ont néanmoins montré que les mutations ponctuelles de la Parkine ont rarement un effet sur sa fonction enzymatique (**Tableau 2**).

β. PINK1

Les premières mutations du gène *PINK1* ont été décrites dans trois familles consanguines avec une maladie de Parkinson autosomique récessive à début précoce [Valente *et al.*, 2004]. Les mutations homozygotes et hétérozygotes composites touchant le gène *PINK1* sont aujourd'hui les deuxièmes en terme de fréquence après les mutations du gène *PARK2* pour les formes autosomiques récessives (**Figure 4**). En fonction des études à travers le monde, les mutations de ce gène expliquent 0 à 15% des formes de maladies de Parkinson [Deas *et al.*, 2011 ; Nuytemans *et al.*, 2010]. Bien que des larges délétions génomiques et parfois de grands réarrangements aient été décrits, la majorité des mutations sont des mutations ponctuelles ou des petites délétions.

Les patients *PINK1* sont cliniquement similaires aux patients *PARK2*, mais tendent en moyenne à mieux répondre au traitement par la L-Dopa [Ibanez *et al.*, 2006]. Le début de la maladie est légèrement plus précoce et se trouve être plus fréquemment associée à des symptômes atypiques, comme la dystonie, des dyskinesies ou une hyper-réflexie [Ephraty *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2005].

Substitution d'acide aminé	Tests d'auto-Ub - sans PINK1 ^{a,b} -		Ub de substrat ^c	Activité E3 ligase <i>in vitro</i> - avec PINK1 ^d -			Tests cellulaires avec CCCP ^e		Analyses structurales de la Parkine "ouverte" et "fermée" ^e		
	<i>In vitro</i> ^a	<i>In vitro</i> ^b	<i>In cellulo</i>	Décharge de l'E2	Miro-Ub	Chaînes libres	Charges d'Ub	Relocalisation	Rayon-X ZEMu	MDS RMSD	MDS RMSF
WT	■	■	■	■	■	■	f	■	-	-	-
UBI											
p.K27N	■	■				■					
p.R33Q			■		■	■			+		
p.P37L						■			+		
p.R42P	■	■	■	■	■	■			+	-f	+
p.A46P						■					
p.K48A						■					
LINKER											
p.T83A											
RING0											
p.C150G											
p.K161N	■	■	■	■	■	■					
p.R163A						■					
p.W183A						■					
p.K211N	■	■		■	■	■					
RING1											
p.T240R	■	■	■			■					
p.R256C	■	■	■			■					
p.Y267H	■	■	■			■					
p.R275W	■	■	■	■	■	■					
IBR											
p.G328E	■	■	■	■	■	■					
p.H433A						■					
REP											
p.R334C	■	■				■					
p.A398T											
REP											
p.W403A											
RING2											
p.T415N	■	■	■	■	■	■					
p.G430D	■	■	■	■	■	■					
p.C431F	■	■	■	■	■	■					
p.C431S	■	■	■	■	■	■					
p.F463A											

Tableau 2 Résumé des défauts fonctionnels dus aux différentes mutations du gène *PARK2* retrouvés chez des sujets atteints de maladie de Parkinson

Données issues d'études précédentes. Les zones vides indiquent que les mutations respectives n'ont pas été analysées avec le test décrit. Les résultats des altérations fonctionnelles sont codés par couleur, en comparaison à la Parkine normale (WT). Bleu : activité/fonction augmentée ; vert : similaire au WT ; jaune : activité/fonction diminuée ; rouge : perte de fonction/activité. Les résultats des altérations structurales sont indiquées par (-) changement mineur, (+) changement modéré, (++) changement majeur. (--) indique une plus faible fluctuation que le WT, suggérant une conformation plus « fermée » (seulement p.T240R). Modifié à partir de [Fiesel *et al.*, 2015].

(a) Test d'auto-ubiquitylation *in vitro* utilisant une Parkine-MBP recombinante, purifiée à partir d'*E. coli*. [Matsuda *et al.*, 2006]. (b) Test d'auto-ubiquitylation *in vitro* utilisant une Parkine-HA immunoprécipitée à partir de cellules COS7. [Hampe *et al.*, 2006]. (c) Ubiquitylation de substrats *in cellulo* observée avec une Parkine-MYC stable exprimée dans des cellules SH-SY5Y qui surexpriment la sous-unité p38 de l'aminoacyl-tRNA synthétase, ou la Synphiline-1 avec l'ubiquitine-HA [Sriram *et al.*, 2005]. (d) Activité E3 ligase de la Parkine purifiée à partir d'*E. coli* mesurée par la décharge de l'Ub de la co-enzyme E2, l'ubiquitylation du substrat modèle Miro1 et la formation de chaînes libres de poly-Ub. [Kazlauskaitė *et al.*, 2014]. (e) Analyse de la charge d'Ub portée par la Parkine et de sa translocation mitochondriale sous CCCP dans des cellules HeLa. [Fiesel *et al.*, 2015]. (f) Pour les tests de charges d'Ub portée par la Parkine, le p.C431S sans autre mutation représente la Parkine « WT ». (g) Le mutant pR42P ne montre pas d'augmentation en RMS pour le site de mutation ou de la région de 6 Angstrom l'entourant. (h) Le mutant p.C150G forme des agrégats cytosoliques et n'est pas adressé aux mitochondries endommagées. (i) Le mutant p.G430D ne montre pas d'activité E3 ligase de la Parkine vers la sous-unité p38 de l'aminoacyl-tRNA synthétase, ou la Synphiline-1. [Sriram *et al.*, 2005]. (j) Ubiquitylation de substrats *in cellulo* observée avec des Parkine WT et mutantes stables exprimée dans des cellules HeLa. Test d'auto-ubiquitylation *in vitro* utilisant une Parkine-MBP recombinante, phosphorylée par PINK1Tc, purifiée à partir d'*E. coli* [Ordureau *et al.*, 2014].

La protéine PINK1 est une serine/thréonine kinase, possédant une séquence d'adressage mitochondrial (MTS) située en N-terminal. De par sa localisation, le fait que la perte de fonction de cette protéine soit à l'origine de formes génétique de maladie de Parkinson conforte l'idée de l'implication d'une dysfonction mitochondriale dans la pathogenèse de cette maladie [Beilina *et al.*, 2005].

γ. DJ-1

Les mutations du gène *DJ-1* expliquent environ 1% des formes juvéniles autosomiques récessives de maladies de Parkinson. La première large délétion a été découverte en 2003 [Bonifati *et al.*, 2003]. Des mutations faux-sens et des indels ont également été décrites. Cliniquement, les patients portant des mutations du gène *DJ-1* présentent une maladie de Parkinson à début précoce, avec une lente progression, ressemblant fortement aux patients portant des mutations des gènes *PARK2* et *PINK1* [Corti *et al.*, 2011].

La protéine DJ-1 a été initialement identifiée en association avec une oncogenèse et une infertilité chez le rat [Andres-Mateos *et al.*, 2007], mais elle est également induite lors d'un stress oxydant où elle est transférée du cytoplasme à la membrane externe de la mitochondrie, lui conférant un rôle protecteur contre la mort cellulaire due à un traitement au paraquat [Canet-Aviles *et al.*, 2004].

δ. VPS13C

VPS13C (*Vacuolar Protein Sorting 13C*) est le dernier gène identifié dont les mutations sont à l'origine de formes familiales autosomiques récessives de maladie de Parkinson. Il a été découvert cette année par notre équipe [Lesage *et al.*, 2016]. Les mutations du gène *VPS13C* sont à l'origine d'une maladie de Parkinson à début précoce, mais à l'inverse des trois gènes précédemment décrits, la maladie se caractérise par une progression rapide et sévère, associée à un déclin cognitif rapide. Les patients répondent cependant bien à la L-Dopa dans les premières années de la maladie.

La protéine Vps13C est retrouvée dans différents organites cellulaires (endosome, appareil de golgi, réticulum endoplasmique, mitochondrie) et sa perte de fonction induit une dysfonction mitochondriale, et par conséquent une activation de la dégradation de ces mitochondries endommagées par autophagie (**Chapitre 4, partie II.1**).

4. Conclusion

L'identification des gènes associés à la maladie de Parkinson a permis d'améliorer la compréhension de ses possibles mécanismes pathogéniques impliqués, et placent la dysfonction du système ubiquitine-protéasome, le stress oxydant, ainsi que la dysfonction mitochondriale au centre de ces mécanismes. Les mutations, ou les polymorphismes retrouvés sur l'ADN^{mt} et sur l'ADN nucléaire semblent reliés à l'apparition de la maladie de Parkinson, ou, bien que ceci soit controversé, seraient *a minima* des facteurs de risque de celle-ci. Parmi les gènes nucléaires, les mutations de *PARK2*, *PINK1*, *PARK7* (DJ1) ou *LRRK2* fournissent des preuves majeures de l'implication d'une dysfonction mitochondriale dans la maladie de Parkinson.

II. La mitochondrie : à la croisée du métabolisme énergétique, de la signalisation et de la mort cellulaire

1. Généralités

Les mitochondries sont des organites cellulaires essentiels caractérisés par leur rôle de générateur énergétique de la cellule, en convertissant l'énergie obtenue par l'alimentation en gradient électrochimique de protons [Chacinska *et al.*, 2009]. Ce gradient de protons permet le fonctionnement de l'ATP synthase, un complexe protéique générant de grandes quantités d'ATP pour la cellule (36 molécules pour la respiration mitochondriale, contre 2 pour la glycolyse, **Paragraphe II.2**). Les mitochondries possèdent également des fonctions centrales dans le métabolisme des acides aminés et des lipides, ainsi que dans la biosynthèse des clusters des

ions-sulfures et de l'hème, et jouent aussi un rôle crucial dans l'apoptose [Hamza *et al.*, 2012]. Leur dysfonction a été mise en cause dans la pathogenèse de diverses maladies et en particulier de maladies neurodégénératives [Harbauer *et al.*, 2014].

Les mitochondries sont composées de plusieurs compartiments spécialisés : deux membranes, la membrane mitochondriale externe (MME) et la membrane mitochondriale interne (MMI) ; et deux compartiments aqueux, l'espace inter-membranaire et la matrice.

2. Un générateur électrique : la respiration cellulaire

La respiration cellulaire est l'ensemble des processus du métabolisme cellulaire mis en place par la cellule permettant de convertir l'énergie chimique contenue dans les nutriments en ATP. Mise à part la glycolyse qui a lieu dans le cytoplasme et qui permet la transformation d'une molécule de glucose en deux molécules d'ATP et en deux molécules de pyruvate, sans nécessité d'oxygène, les autres étapes de la respiration cellulaire se passent au niveau de la mitochondrie. Ces autres étapes comprennent (1) la décarboxylation du pyruvate, (2) le cycle de Krebs et (3) la phosphorylation oxydative.

Le pyruvate obtenu lors de la réaction de glycolyse est ensuite oxydé en acétyl-CoA et NADH au cours d'une réaction qui libère du CO₂, par un processus de décarboxylation catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA synthétisé est ensuite dégradé dans la matrice par le cycle de Krebs pour donner une molécule de CO₂ et permettre la formation de trois molécules de NADH, d'une molécule de FADH₂ et d'une molécule de GTP, équivalent à une molécule d'ATP. Le NADH et le FADH₂ peuvent être oxydés par la chaîne respiratoire pour produire davantage d'ATP.

Chez les eucaryotes, le processus de phosphorylation oxydative se déroule dans la MMI, et plus précisément au niveau des crêtes. Ce processus est composé de : (1) la chaîne respiratoire, qui assure l'oxydation des coenzymes réduites par le cycle de Krebs et (2) l'ATP synthase, enzyme capable de phosphoryler l'ADP en ATP à partir de l'énergie libérée par la chaîne respiratoire au cours de l'oxydation

des coenzymes. Cette énergie est emmagasinée sous forme de gradient électrochimique à travers la MMI sous l'effet de pompes à protons qui génèrent un gradient de concentration de protons au cours de la circulation des électrons le long de la chaîne respiratoire. L'étape finale de cette dernière est la réduction d'une molécule d'oxygène par quatre électrons pour former deux molécules d'eau [Gnaiger *et al.*, 1995].

3. La dynamique mitochondriale et le transport

Les mitochondries forment un réseau dynamique en perpétuel remodelage, mettant en jeu des processus de fusion et de fission (**Figure 6**).

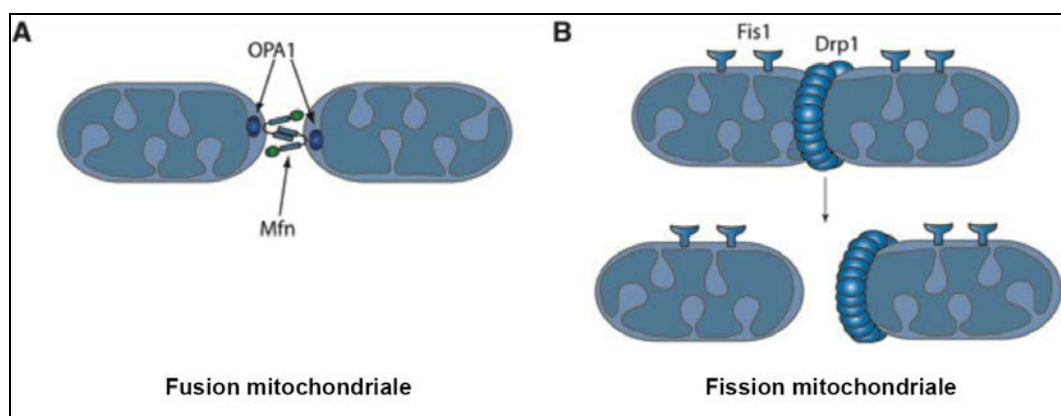


Figure 6 La dynamique mitochondriale

(A) La machinerie de fusion mitochondriale est composée des protéines mitofusines (Mfn1 et Mfn2) et OPA1, où les protéines Mfn1 et 2 sont à la MME et OPA1 est localisée dans l'espace intermembranaire. (B) La machinerie de fission mitochondriale est quant à elle composée des protéines Fis et Drp1. Adapté de [Chen *et al.*, 2006].

a. La fusion mitochondriale

Le processus de fusion mitochondriale chez les mammifères est contrôlé par les protéines Mfn1 (mitofusine 1), Mfn2 (mitofusine 2) et OPA1 (optic atrophy 1). Mfn1 et Mfn2 sont des GTPases dynamine-*like* responsables de la fusion de la MME. OPA1 est aussi une GTPase dynamine-*like*, mais est responsable de la fusion de la MMI [Belenguer *et al.*, 2013]. On peut noter qu'OPA1 est clivée par la protéase OMA1 lorsque les mitochondries sont dépolarisées par un traitement au protonophore CCCP (*Carbonyl Cyanide m-Chloro Phenyl hydrazine*), ce qui résulte

en une fragmentation mitochondriale en empêchant leur fusion [Ehses *et al.*, 2009 ; Head *et al.*, 2009].

b. La fission mitochondriale

Le processus de fission mitochondriale est quant à lui contrôlé par la protéine Drp1 (*Dynamamin-related protein 1*), qui est aussi une GTPase *dynamamine-like*. Drp1 est cytosolique et recrutée à la MME afin de permettre le clivage d'une mitochondrie en deux par un phénomène de constriction. Drp1 interagit avec quatre récepteurs mitochondriaux : Fis1 (*Fission 1*), Mff (*Mitochondria fission factor*), MID49 et MID51 (*Mitochondria Dynamics proteins of 49 and 51 kDa*). Il semblerait que dans les cellules de mammifères, l'interaction entre Fis1 et Drp1 joue un rôle mineur dans la régulation de la fission mitochondriale, en comparaison à l'interaction entre Drp1 et les trois autres récepteurs [Gandre-Babbe *et al.*, 2008 ; Loson *et al.*, 2013 ; Otera *et al.*, 2010 ; Palmer *et al.*, 2011 ; Westermann, 2010].

c. Le transport

En plus de ces processus de fusion et fission, le mouvement des mitochondries le long du cytosquelette est très important pour leur distribution et pour leur renouvellement [Mishra *et al.*, 2014]. Les mitochondries des cellules de mammifère sont pour la plupart transportées le long des microtubules par les kinésines pour le sens antérograde, et les dynéines pour le sens rétrograde [Saxton *et al.*, 2012]. La liaison des mitochondries aux kinésines est régulée par différents adaptateurs moléculaires dont Milton, qui interagit directement avec la protéine Miro (*Mitochondrial Rho GTPase*) à la MME. Curieusement, Mfn1 et Mfn2 interagissent également avec Miro et Milton, et la perte d'Mfn2 suffit à induire un dysfonctionnement du transport mitochondrial dans les neurones [Misko *et al.*, 2010].

4. L'import mitochondrial

Les mitochondries sont composées d'environ 1000 à 1500 protéines différentes [Pagliarini *et al.*, 2008 ; Prokisch *et al.*, 2004 ; Reinders *et al.*, 2006 ; Schmidt *et al.*, 2010]. Du fait de leur origine endosymbiotique issue d'un ancêtre

procaryote, elles possèdent leur propre génome mitochondrial. Or chez l'homme, seulement 13 protéines sont codées par ce génome, et il s'agit pour la plupart, de protéines composant la chaîne respiratoire mitochondriale. La grande majorité des protéines mitochondriales est donc issue du génome nucléaire, ou elles sont synthétisées dans le cytosol sous formes de précurseurs par les ribosomes, et transférées dans les différents compartiments mitochondriaux par différentes machineries d'import. Cette adressage mitochondrial met en jeu deux principales voies d'import : la voie d'import classique des pré-protéines à signal d'adressage N-terminal (voie « Tom20 ») et la voie des protéines polytopiques hydrophobes adressées essentiellement à la MMI (voie « Tom70 ») (**Figure 7**).

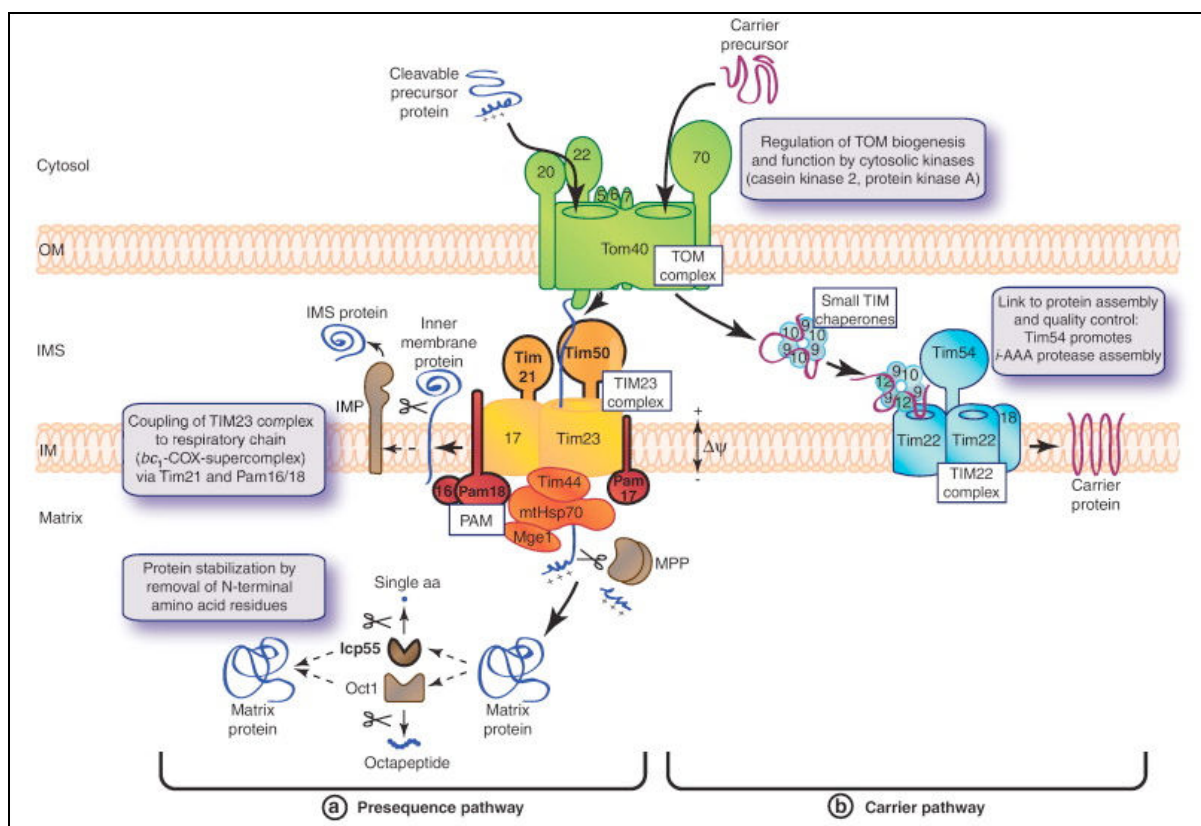


Figure 7 Les deux voies classiques d'import mitochondrial

(a) La voie d'import classique des pré-protéines (voie « Tom20 ») et (b) la voie des protéines polytopiques hydrophobes adressées essentiellement à la membrane mitochondriale interne (voie « Tom70 »). D'après [Becker *et al.*, 2012].

a. La voie d'import classique des pré-protéines

Cette première voie permet l'import des protéines possédant des pré-séquences clivables [Chacinska *et al.*, 2009 ; Neupert *et al.*, 2007]. Elle est utilisée par plus de 60% des protéines mitochondriales [Vogtle *et al.*, 2009]. Les précurseurs synthétisés dans le cytosol possèdent des séquences clivables en N-terminal nommées pré-séquences, qui sont chargées positivement et reconnues par les récepteurs Tom20 et Tom22 du complexe multiprotéique d'import mitochondrial TOM (*Translocase of the outer membrane*), situé à la MME [Abe *et al.*, 2000 ; Brix *et al.*, 1999 ; Mayer *et al.*, 1995 ; Meisinger *et al.*, 2001 ; Saitoh *et al.*, 2007 ; van Wilpe *et al.*, 1999]. Après avoir été importées à travers ce complexe, les pré-protéines clivables traversent le complexe TIM23, situé à la MMI. C'est au niveau de ce dernier que le $\Delta\Psi^{\text{mit}}$ exerce un effet électrophorétique sur les pré-séquences chargées positivement [Martin *et al.*, 1991], et que la machinerie PAM (*Presequence translocase-Associated Motor*) permet l'import de ces pré-protéines à la matrice [Chacinska *et al.*, 2005 ; Mapa *et al.*, 2010], où elles vont subir un clivage par la peptidase mitochondriale MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*). A noter que certaines pré-protéines possèdent un domaine hydrophobe situé juste après la pré-séquence, ce qui induit un arrêt de leur import au niveau du complexe TIM23, et leur relargage au sein de la MMI [Chacinska *et al.*, 2005 ; Glick *et al.*, 1992 ; Meier *et al.*, 2005].

b. La voie d'import des protéines polytopiques hydrophobes adressées aux membranes

Les protéines polytopiques hydrophobes sont synthétisées sans pré-séquences dans le cytosol et sont importées par une autre voie d'import [Curran *et al.*, 2002 ; Endres *et al.*, 1999 ; Rehling *et al.*, 2003]. Les membres de la grande famille des transporteurs de métabolites sont les principaux substrats de cette voie dite « *carrier pathway* ». Les précurseurs de ces protéines contiennent un signal d'adressage interne dans la partie mature de la protéine [Brix *et al.*, 1999]. En effet, les précurseurs des protéines mettant en jeu cette seconde voie sont reconnus par le récepteur Tom70 de la machinerie TOM, passent à travers le canal Tom40, et

sont ensuite transportés par d'autres machineries : des petites chaperonnes de l'espace inter-membranaire et le complexe TIM22 de la MMI.

5. Import *versus* réponse au stress mitochondrial : l'UPR^{mt}

Récemment, les mécanismes d'import à la mitochondrie ont émergé dans la littérature en tant qu'éléments clés de la communication entre mitochondrie et noyau, conduisant à la mise en place de programmes transcriptionnels en réponse au stress mitochondrial, tels que l'UPR^{mt} (*Unfolded Protein Response, mitochondrial*) [Haynes *et al.*, 2013 ; Rainbolt *et al.*, 2013].

L'UPR est une réponse transcriptionnelle protectrice ou adaptative promouvant la survie cellulaire lors d'un stress. Elle a tout d'abord été très bien caractérisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE). L'UPR^{RE} est une voie de signalisation divisée en trois parties, et régulée par trois protéines localisées à la membrane du RE : IRE1 (*Inositol- REquiring 1*), PERK (*Protein-inase-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) et ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), qui gèrent le statut de repliement des protéines dans la lumière du RE, par l'interaction directe avec la chaperonne BiP/GRP78 (*chaperone-binding immunoglobulin protein*) [Ma *et al.*, 2001 ; Ron *et al.*, 2007] (**Figure 8**). Dans la branche la plus conservée, IRE1 est activé quand il est dissocié de BiP, ce qui résulte en l'oligomérisation et en l'activation de son domaine cytosolique qui contient une séquence permettant l'épissage de l'ARN messager d'*XBP1* (*X-box binding protein 1*). *XBP1* « épissé » est ensuite traduit en bZip (*basic leucine zipper*), un facteur de transcription qui est adressé au noyau où il induit l'expression de chaperonnes et de composants des machineries de dégradation du RE [Calfon *et al.*, 2002 ; Yoshida *et al.*, 2001].

L'UPR mitochondriale (UPR^{mt}) a été mise en évidence la première fois en 1996 dans des cellules de mammifère en culture [Martinus *et al.*, 1996 ; Zhao *et al.*, 2002]. Lors d'un stress mitochondrial, des gènes codant pour des chaperonnes et des protéases mitochondriales sont transcrits, permettant d'éliminer les protéines mitochondriales mal repliées [Wang *et al.*, 2008]. Tandis que l'induction de l'UPR^{mt} chez les mammifères a lieu lors de différentes formes de stress mitochondrial

(accumulation de protéines mal conformées dans la matrice, déplétion d'une partie du génome mitochondrial, déplétion en protéases mitochondriales, agents générant de hauts niveaux de radicaux libres, etc.), sa régulation reste peu comprise [Haynes *et al.*, 2013].

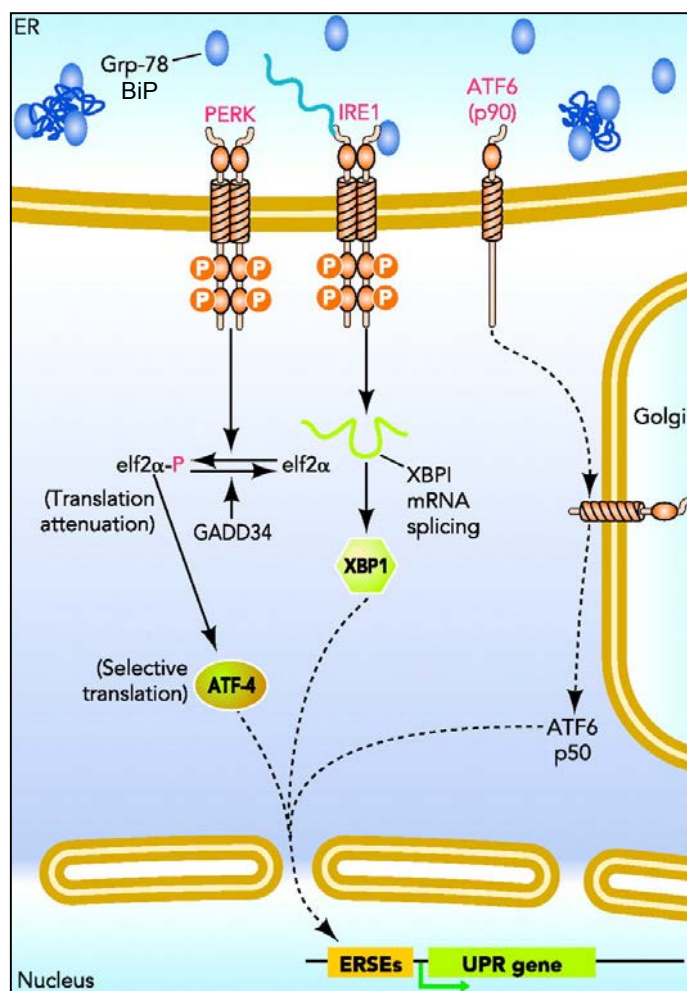


Figure 8 L'UPR^{ER} dans les cellules de mammifères

L'UPR est contrôlée par trois protéines situées dans la membrane du RE ; la kinase PERK est activée par dimérisation et par phosphorylation. Une fois activée, elle phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , ce qui résulte en une atténuation du processus de traduction. Lorsqu'il est phosphorylé, eIF2 α augmente sélectivement la traduction d'ATF4, induisant lui-même l'expression de gènes de l'UPR ; l'activation d'IRE1 par dimérisation et par phosphorylation cause l'épissage de l'ARN messager d'*XBP1*. La traduction d'*XBP1* produit un facteur de transcription qui augmente l'expression de gènes cibles *via* le promoteur ERSE ; l'activation d'ATF6 implique une protéolyse intra-membranaire régulée. La protéine transite du RE à l'appareil de Golgi où elle subit une maturation pour donner un facteur de transcription dirigé au noyau et se liant aux promoteurs ERSEs (*ER Stress response Element*) des gènes de l'UPR. Adapté de [Lai *et al.*, 2007].

Il semblerait cependant que la communication mitochondrie-noyau dans les cellules de mammifères requerrait le facteur de transcription CHOP [Zhao *et al.*, 2002]. Plus récemment, la sirtuine mitochondriale 3 (Sirt3) a été identifiée comme régulateur de l'activité de l'UPR^{mt} par la dé-acétylation du facteur de transcription FOXO3A (*Forkhead box O3*), ce qui promouvrait son accumulation dans le noyau et permettrait l'expression de gènes antioxydants [Papa *et al.*, 2014]. Le récepteur à l'estrogène a aussi été montré comme répondant au stress mitochondrial, dans le but d'éliminer les protéines mitochondriales mal repliées au niveau de l'espace inter-

membranaire. Ce processus mettrait en jeu une augmentation de la transcription de la protéase mitochondriale Omi/HtrA2 [Papa *et al.*, 2011 ; Papa *et al.*, 2014].

La régulation de l'UPR^{mt} est mieux comprise chez le ver *Caenorhabditis elegans* où l'on sait que cette réponse est régulée par le facteur de transcription ATFS-1 (*Activating Transcription Factor associated with Stress-1*), requis pour l'induction de la transcription des chaperonnes mitochondriales lors d'un stress [Haynes *et al.*, 2010]. ATFS-1 possède une séquence d'adressage mitochondriale et est constitutivement importé dans les mitochondries fonctionnelles, où il est par la suite dégradé par la protéase Lon [Nargund *et al.*, 2012]. De manière intéressante, ATFS-1 possède également une séquence de localisation nucléaire. Lorsque l'import mitochondrial est bloqué, ATFS-1 n'est pas dégradé dans le cytosol mais va migrer vers le noyau [Wright *et al.*, 2001] où il va induire la transcription de plus de 400 gènes constituant l'UPR^{mt}, ce qui inclut des protéases et chaperonnes mitochondriales, des acteurs de la fission mitochondriale, des composants des machineries d'import et des gènes antioxydants et de l'immunité [Nargund *et al.*, 2012] (**Figure 9**). Ces auteurs ont aussi montré qu'ATFS-1 se liait directement aux promoteurs des gènes de la machinerie de phosphorylation oxydative (OXPHOS), aussi bien au niveau des génomes mitochondriaux que nucléaires, ce qui permettait de maintenir l'efficacité de ce processus au cours de l'UPR^{mt} [Nargund *et al.*, 2015].

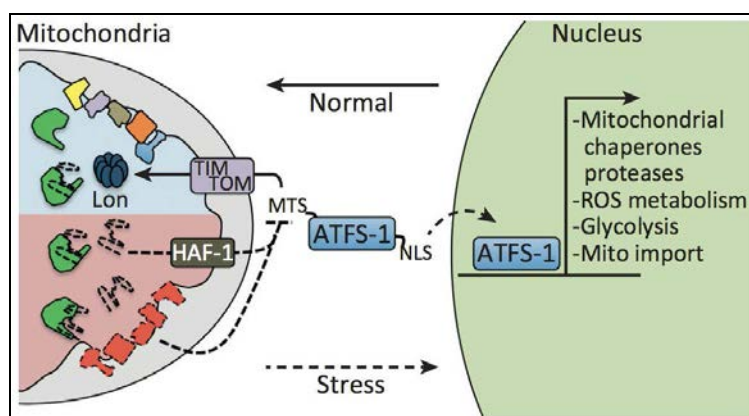


Figure 9 L'UPR^{mt} chez *Caenorhabditis elegans*

Illustration des mécanismes de signalisation régulant l'induction de l'UPR^{mt} chez *Caenorhabditis elegans*. L'UPR^{mt} est activée lors d'une dysfonction mitochondriale ou d'un stress, ce qui résulte en une induction de la transcription de gènes protecteurs, comme les chaperonnes et protéases mitochondriales, impliquées dans la détoxification des radicaux libres, de protéines permettant la glycolyse et de protéines des machineries d'import protéique. D'après [Haynes *et al.*, 2013].

6. Import *versus* mort cellulaire : l'activation du système protéasomal

Des dysfonctions mitochondriales ont été reliées à différentes pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique. Dans ces pathologies, ces dysfonctions contribuent à des anomalies cellulaires, aussi bien en étant à l'origine d'anomalies énergétiques, qu'en induisant une mort cellulaire par apoptose. Dans une étude très récente chez la levure parue en 2015, Wang *et al.* ont identifié 40 gènes diminuant le taux de mort cellulaire lorsqu'ils sont surexprimés dans des cellules contenant des mitochondries endommagées [Wang *et al.*, 2015]. Les protéines codées par ces gènes ne sont pourtant pas mitochondriales, ce qui suggère que des dysfonctions cellulaires altèrent des processus cytosoliques. En effet, plusieurs de ces protéines sont connues pour diminuer l'efficacité de synthèse protéique dans le cytosol, ou pour permettre leur dégradation dans ce même compartiment. Ces résultats ont été confirmés par une autre approche où les transcrits ont été analysés dans des conditions où l'import mitochondrial est altéré par un traitement au CCCP [Wrobel *et al.*, 2015]. L'efficacité de l'activité protéasomale est aussi augmentée dans ce même modèle.

Ensembles, ces deux études démontrent que lors d'une perturbation de l'activité mitochondriale, les précurseurs des protéines adressées à ces organites s'accumulent dans le cytosol, ce qui va entre autre déclencher une augmentation importante de l'activité protéasomale et ainsi leur dégradation rapide, de manière à préserver la survie cellulaire. Les auteurs proposent que l'accumulation de précurseurs protéiques dans le cytosol serait un inducteur de mort cellulaire lorsque les mitochondries ne sont pas fonctionnelles [Wang *et al.*, 2015].

7. Turn-over des mitochondries

a. Entre dégradation...

Les mitochondries ne sont pas des organites immortels. Elles sont vouées à être renouvelées au cours du temps, du fait de leur vieillissement ou de leur endommagement. Le contrôle de leur élimination est donc un processus essentiel

mis en place par la cellule dans le but de se protéger du stress oxydant et de l'apoptose. Pour cela, la cellule a développé un processus de dégradation nommé mitophagie, qui est la dégradation sélective des mitochondries par autophagie, mettant en jeu le lysosome.

Chez les mammifères, l'autophagie est stimulée en conditions de stress, telles que la carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance ou l'hypoxie. La protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) joue un rôle clé dans la régulation de l'autophagie, car dans des conditions physiologiques, elle permet son inhibition. En condition de stress, mTOR est inactivée, ce qui lève l'inhibition de l'autophagie. D'un point de vue mécanistique, l'induction de l'autophagie résulte en la déphosphorylation et en l'activation de deux kinases, ULK1 et ULK2, qui composent le complexe ULK (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase*) [Chan, 2012]. ULK va phosphoryler et activer Becline-1, qui fait également partie d'un complexe protéique, le complexe Becline-1 [Itakura *et al.*, 2008 ; Kang *et al.*, 2011]. Les complexes ULK et Becline-1 sont ensuite relocalisés au niveau du site d'initiation de l'autophagosome, nommé phagophore, où ils vont, en collaboration avec les protéines DFPC1 (*double FYVE domain-containing protein 1*) et WIPI1 (*WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 1*), contribuer à l'activation de composants de l'autophagie situés en aval de la voie [Hara *et al.*, 2008 ; Lazarou *et al.*, 2015].

Le déroulement ultérieur du processus autophagique repose essentiellement sur deux systèmes de conjugaison analogues au système d'ubiquitylation des protéines (**Figure 10**): (1) le premier système lie de façon covalente les protéines Atg12 et Atg5. Ensemble, ces deux protéines vont se lier à Atg16L1 pour former un complexe *E3-like*, qui participe au fonctionnement d'un second système de conjugaison [Hanada *et al.*, 2007]. (2) Le second complexe lie Atg3, qui attache les protéines LC3 (des protéines associées aux microtubules permettant le contrôle de l'interaction entre les microtubules et les composants du cytosquelette) à la phosphatidylethanolamine (PE), au niveau de la surface des autophagosomes [Kabeya *et al.*, 2004]. LC3-PE contribue ainsi à la fermeture des autophagosomes [Fujita *et al.*, 2008], et permet l'attache de cargos spécifiques et de protéines adaptatrices comme p62, une protéine d'échafaudage qui permet de réguler

différents processus biologiques, comme l'apoptose, la régulation de la transcription, et l'autophagie [Park *et al.*, 2014 ; Rea *et al.*, 2014]. Une fois mature, l'autophagosome fusionne avec un lysosome par un mécanisme impliquant les protéines SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*, responsables de la fusion membranaire et du trafic membranaire) pour donner un autolysosome [Fader *et al.*, 2009]. Après la fusion, LC3 est retenu au niveau du coté interne des vésicules et dégradé en même temps que le cargo [Satoo *et al.*, 2009]. Les autolysosomes sont par la suite dégradés par l'action de protéases lysosomales telles que les cathepsines [Repnik *et al.*, 2012].

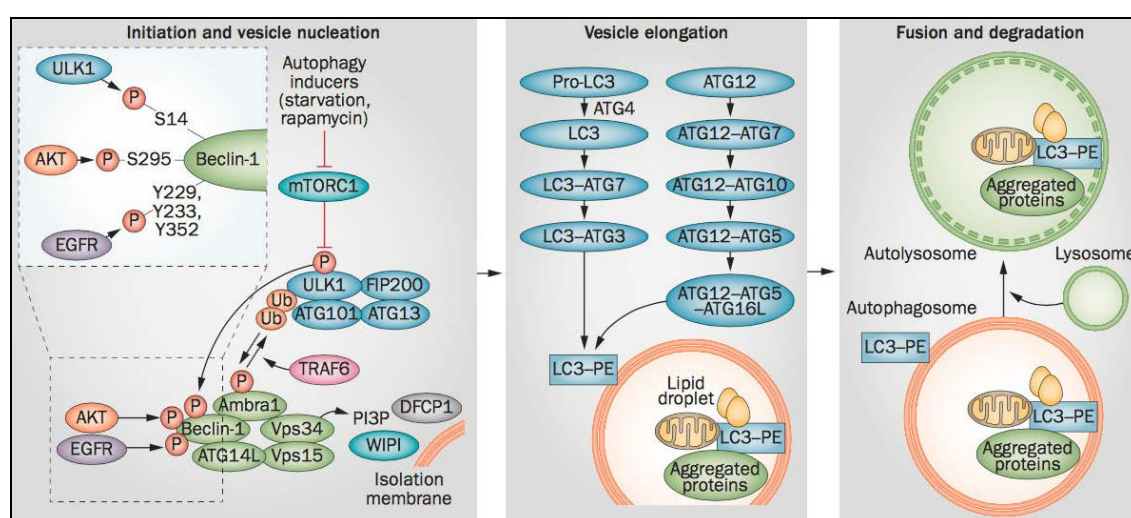


Figure 10 Voies de signalisation régulant l'autophagie

Les stimuli de l'autophagie activent le complexe ULK1, ce qui augmente l'activité du complexe Becline-1-Vps34 par la phosphorylation d'Ambra1 et de la Becline-1. Ambra1 induit l'autophagie en régulant la stabilité de l'activité de ULK1 par son interaction avec TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*). PI3P (*Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate*), produit par Vps34 recrute des protéines effectrices pour induire la formation de l'autophagosome. L'élongation de ce dernier est contrôlée par le complexe Atg12-Atg5-Atg16L-LC3-PE. Une fois la formation des vésicules autophagiques complétée, l'autophagosome mature fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome, lieu où les molécules et les organites sont séquestrés et dégradés. D'après [Kim *et al.*, 2014].

Il y existe plusieurs voies de contrôle de la mitophagie dans les cellules de mammifères et la celle mettant en jeu la voie PINK1/Parkine est la mieux caractérisée (**Paragraphe III.3.e.5**). Les autres voies mettent en jeu des récepteurs situés à la MME (NIX1, BNIP3 et FUNDC1). Tous ces récepteurs contiennent une séquence LIR (*LC3-Interacting Region*) qui lie LC3, conduisant à la dégradation des mitochondries [Lazarou, 2015]. La sélection des mitochondries à éliminer est intimement reliée à un faible $\Delta\Psi^{\text{mit}}$, ainsi qu'à d'autres évènements mitochondriaux,

tels que la production de radicaux libres [Kim *et al.*, 2011]. En effet, les mitochondries avec un $\Delta\Psi^{\text{mit}}$ bas ne produisent pas d'ATP ; leur élimination n'aura pas d'impact majeur sur les niveaux d'ATP cellulaire. De plus, leur élimination atténuera la production de radicaux libres, la population mitochondriale restante aura donc une meilleure homéostasie [Gottlieb *et al.*, 2015].

b. ...et néo-synthèse

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, l'élimination des mitochondries doit être compensée par la formation de nouvelles mitochondries fonctionnelles. Ce processus, nommé biogenèse mitochondriale est activé par différents signaux de stress cellulaire ou en réponse à des stimuli environnementaux [Sanchis-Gomar *et al.*, 2014]. Il met en jeu une cascade de facteurs de transcription qui transitent du noyau à la mitochondrie pour permettre la transcription de gènes clés (**Figure 11**). Parmi ces facteurs se trouve le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Co-activator 1-alpha*), qui est le régulateur clé du processus de biogenèse mitochondriale. Il travaille en tandem avec NRF2 (*Nuclear Respiratory Factor 2*) pour co-activer NRF1 (*Nuclear Respiratory Factor 1*) [Lehman *et al.*, 2000]. Ensemble, NRF1 et NRF2 induisent la transcription de protéines codées par des gènes nucléaires et mitochondriaux, et en particulier des protéines composant les machineries d'import ainsi que des cofacteurs requis pour l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Ils régulent également les facteurs requis pour les processus de transcription et de traduction de l'ADN^{mt}, dont Tfam (*mitochondrial transcription factor A*). De plus, Tfam n'est pas seulement important pour la transcription des gènes mitochondriaux, mais il est aussi primordial pour la maintenance du nombre de copies de l'ADN^{mt} [Scarpulla, 2008].

On peut noter que la surexpression de PGC-1 α est suffisante pour induire la biogenèse mitochondriale [Wende *et al.*, 2007], alors que son acétylation supprime son activité de co-activateur transcriptionnel, ce qui limite son contrôle de la biogenèse, même lorsque la protéine est en excès.

L'activation de cette cascade transcriptionnelle peut être initiée par différents évènements de signalisation. L'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) est un

régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale car il régule le métabolisme énergétique intracellulaire en réponse à des crises énergétiques aiguës [Hardie, 2007]. La CaMKIV (*Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV*) est un autre acteur majeur de ce processus. Il a entre autre été noté que la CaMKIV influence l'expression des gènes des fibres oxydatives des myocytes [Wu *et al.*, 2000]. Plus récemment, il a été montré que le NO (*Nitric Oxide*), la SIRT1 (*sirtuin (Silent mating Type Information Regulation 2 homologue) 1*), le co-activateur TORC (*Transducer Of Regulated CREB (cAMP-Response-Element-Binding protein)*), la phosphatase calcineurin, la kinase p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et le corépresseur transcriptionnel RIP140 (*Receptor-Interacting Protein 140*) pouvaient induire la biogenèse mitochondriale [Chin *et al.*, 1998 ; Nisoli *et al.*, 2003 ; Rodgers *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2006 ; Zetser *et al.*, 1999].

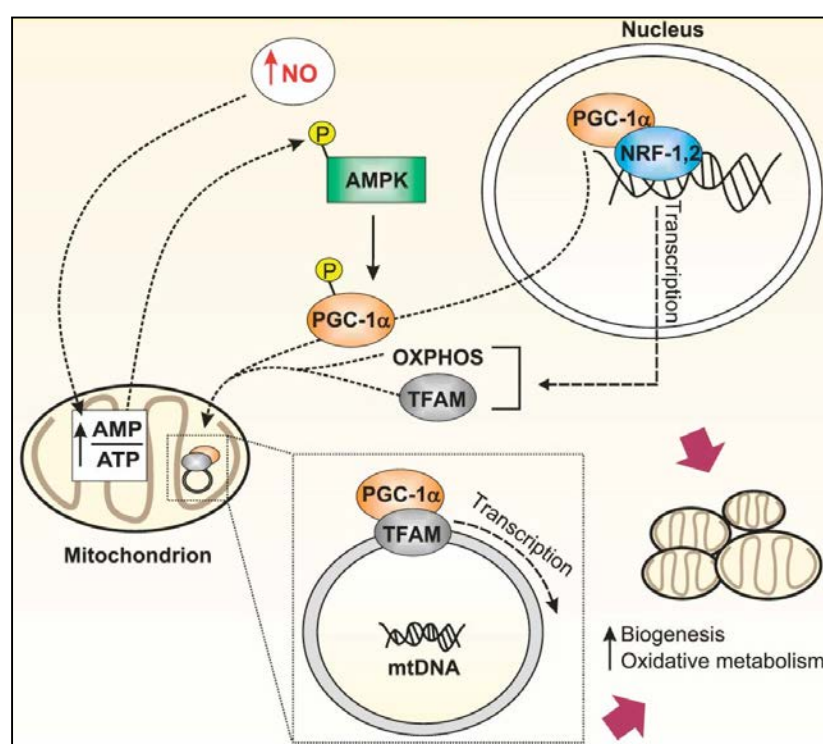


Figure 11 Rôle de PGC-1α dans la coordination de l'expression de la biogenèse mitochondriale dans les cellules de mammifères

PGC-1α interagit avec les facteurs de transcription NRF1 et NRF2 et induit l'expression de gènes mitochondriaux codés par le génome nucléaire, incluant Tfam et les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS). D'après [Baldelli *et al.*, 2014].

c. Balance entre biogenèse et mitophagie

Le maintien de l'homéostasie mitochondriale nécessite à la fois la clairance des mitochondries endommagées et la génération de nouvelles, fonctionnelles. De nouvelles preuves indiquent qu'une bonne coordination entre ces deux processus

est essentielle. Plusieurs molécules ont été impliquées dans cette coordination, mais la compréhension générale de ce processus reste à élucider. Par exemple, les sirtuines modulent le métabolisme énergétique et la longévité grâce à leur fonction d'histone déacétylase. Par exemple, SIRT1 déacétyle PGC-1 α pour induire l'expression génique et la biogenèse mitochondriale dans les muscles squelettiques et stimule l'autophagie [Gerhart-Hines *et al.*, 2007]. Son absence est à l'origine de l'accumulation de mitochondries aberrantes [Jager *et al.*, 2007]. En plus d'induire la biogenèse mitochondriale par PGC-1 α , l'AMPK est impliquée dans le processus d'autophagie. En effet, sa perte, ainsi que celle de sa cible ULK1, inhibe l'autophagie, ce qui cause une accumulation aberrante de la protéine p62 et diminue l'efficacité de la mitophagie [Egan *et al.*, 2011]. Chez *Caenorhabditis elegans*, SKN-1, l'homologue de NRF2, est activé lors d'un stress oxydant, en réponse à une dysfonction mitochondriale et contrôle l'expression de divers gènes de la biogenèse mitochondriale. L'activité transcriptionnelle de SKN-1 apparaît alors essentielle dans la maintenance de l'homéostasie mitochondriale [Schmeisser *et al.*, 2013 ; Staab *et al.*, 2014].

De manière intéressante, plusieurs domaines régulateurs trouvés sur les promoteurs des gènes codant pour les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS) seraient aussi présents sur les promoteurs des gènes de l'autophagie, ce qui suggère leur régulation coordonnée [Gottlieb *et al.*, 2015].

III. PINK1 et Parkine : les anges gardiens des mitochondries

1. L'origine

La première évidence d'un rôle de l'E3 ubiquitine-protéine ligase Parkine au niveau mitochondrial a été apportée par notre laboratoire en 2003. Darios *et al.* ont montré que la surexpression de Parkine dans les cellules immortalisées PC12 différenciées retardait le gonflement des mitochondries et le relargage du cytochrome *c* de mitochondries traitées par le céramide, un sphingolipide impliqué dans divers processus allant de la prolifération à la mort cellulaire [Darios *et al.*,

2003]. Différentes études chez la drosophile ont montré que l'absence de Parkine conduit à une dégénérescence des muscles permettant le vol, associée à des défauts mitochondriaux précoces (structures anormales, mitochondries gonflées) [Greene *et al.*, 2003 ; Pesah *et al.*, 2004]. De manière surprenante, des phénotypes très similaires ont été décrits chez les drosophiles portant des mutations perte de fonction dans le gène orthologue de *PINK1* [Clark *et al.*, 2006 ; Deng *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2006]. De plus, la surexpression de Parkine corrigeait les défauts dus à la déficience en *PINK1*, alors que l'inverse n'était pas vrai. Enfin, la double mutation des gènes *PINK1* et *PARK2* ne provoquait pas un phénotype plus sévère que les simples mutations. Ensemble, ces données indiquent que *PINK1* et Parkine agissent au sein d'une même voie génétique, où *PINK1* est en amont de la Parkine.

2. *PINK1*, Parkine, dynamique et transport mitochondrial

Des études plus récentes, toujours chez la drosophile ont permis de mettre en évidence des interactions entre *PINK1* et les protéines essentielles aux processus de fusion et fission mitochondriales (**Paragraphe II.3**). Par exemple, les drosophiles *PINK1* et *PARK2* possédant une copie supplémentaire du gène de la protéine pro-fission Drp1 n'avaient pas d'altérations mitochondriales et de dégénérescence des muscles contrôlant le mouvement des ailes [Poole *et al.*, 2008], ce qui suggère que *PINK1* et Parkine stimulent la fission mitochondriale *via* Drp1. Dans ce même sens, des mutations « perte de fonction » des gènes orthologues d'*OPA1* ou de *Mfn1* entraînaient des effets bénéfiques sur les phénotypes induits par les déficiences en *PINK1* et en Parkine dans ce modèle [Deng *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2008].

Les résultats se sont révélés moins clairs et contradictoire dans les cellules de mammifères. La Parkine a ainsi été reportée comme promouvant aussi bien la dégradation des protéines pro-fission Drp1, Fis1 que les protéines pro-fusion Mfn1 et Mfn2, suggérant que la maintenance de la qualité mitochondriale requiert dans certaines circonstances différentes adaptations du réseau mitochondrial [Corti *et al.*, 2013].

Par exemple, à l'inverse des observations faites chez la drosophile, une étude dans les cellules tumorales HeLa montre que la surexpression de PINK1 augmente l'inter-connectivité entre les mitochondries et que son absence induit une fragmentation mitochondriale importante [Dagda *et al.*, 2009 ; Lutz *et al.*, 2009]. D'un autre côté, les mitochondries de fibroblastes humains issus de patients portant des mutations du gène *PARK2* semblent plus ramifiées que dans des cellules issues d'individus contrôles [Mortiboys *et al.*, 2008]. Enfin, des études dans les cellules COS7 montrent qu'une surexpression de PINK1 conduit à des mitochondries plus fragmentées, alors que les mitochondries sont à l'inverse plus longues et plus tubulaires en son absence, et que cet effet peut être compensé par une surexpression de Drp1 [Yang *et al.*, 2008]. Egalement mis en évidence plus récemment dans une étude réalisée avec des neurones en culture primaire [Yu *et al.*, 2011], ces résultats suggèrent que les protéines PINK1 et Parkine joueraient un rôle dans la régulation de la balance entre la fusion et la fission mitochondriale, avec des effets potentiels directs ou indirects sur l'activité de différents composants moléculaires de la machinerie de dynamique mitochondriale, et une résultante nette en faveur d'une fission ou une fusion mitochondriale indépendante des conditions expérimentales et des types cellulaires.

Aussi, la perte de fonction des protéines PINK1, Parkine ou DJ-1 conduit dans certains modèles à un déséquilibre de la balance de fusion/fission mitochondriale en faveur de la fission, ce qui induit (1) une mitophagie, et (2) dans des conditions extrêmes, une mort cellulaire par apoptose [Twig *et al.*, 2011]. A l'inverse, la perte de fonction des protéines PINK1, Parkine et la protéase mitochondriale HtrA2 (dont les mutations du gène sont également à l'origine de forme autosomique dominante de maladie de Parkinson) conduisent dans d'autres modèles à un déséquilibre de cette balance en faveur de la fusion. Du fait de l'impossibilité des cellules à éliminer les mitochondries endommagées, ce déséquilibre mène uniquement à une mort cellulaire [Burbulla *et al.*, 2010] (**Figure 12**).

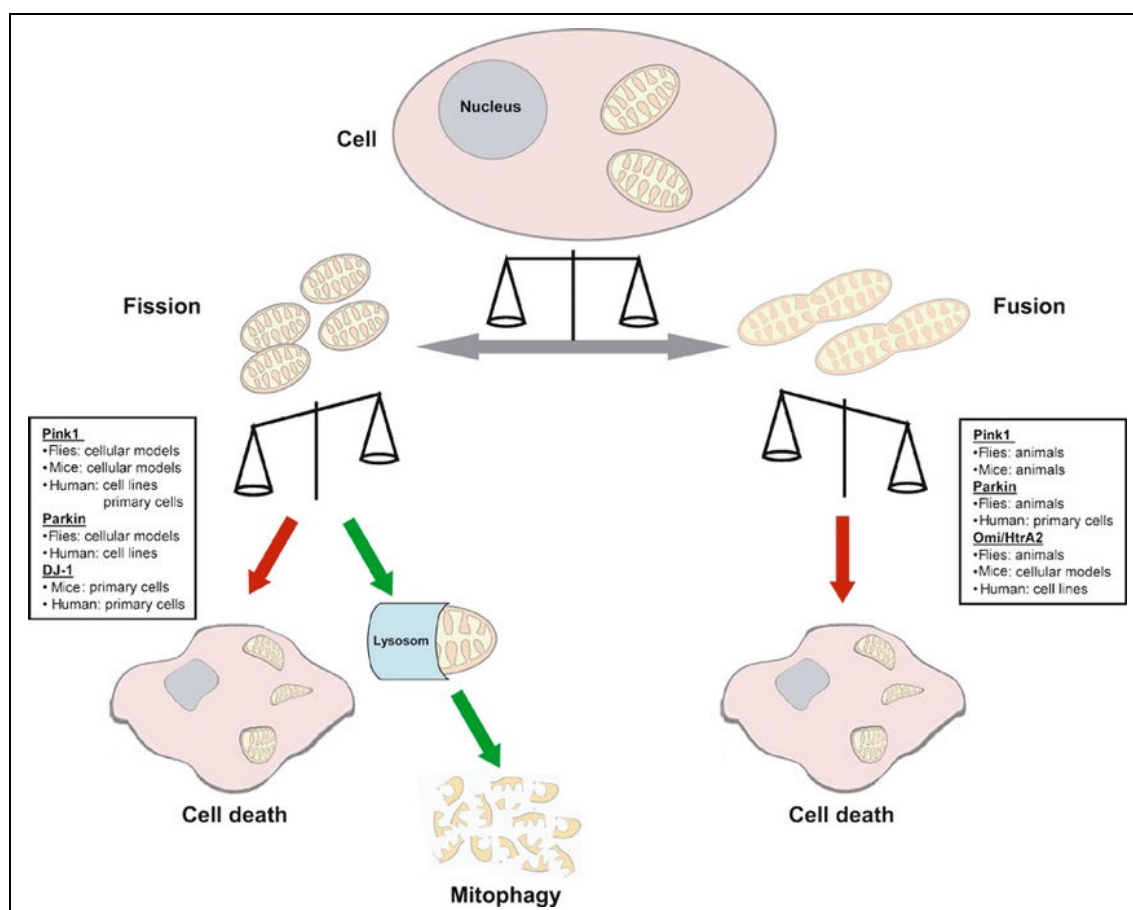


Figure 12 Représentation schématique de la balance fusion/fission et des conséquences de son déséquilibre

Dans des conditions physiologiques, les processus de fusion et fission mitochondriales sont en constante balance afin de maintenir l'homéostasie de ces organites. Lorsque ce système est dérégulé vers une augmentation de l'un des deux processus, les fonctions cellulaires sont fortement altérées. D'après [Burbulla *et al.*, 2010].

Vives-Bauza *et al.* ont été les premiers à proposer que la Parkine et PINK1 participent au processus de transport des mitochondries endommagées le long du cytosquelette, les conduisant vers une région péri-nucléaire riche en lysosomes [Vives-Bauza *et al.*, 2010]. Ce processus impliquerait les protéines Miro et Milton décrites ci-dessus (**Paragraphe II.3.c**), et qui avaient déjà été trouvées associées à un complexe contenant la protéine PINK1 [Weihofen *et al.*, 2009]. Il a aussi été proposé que PINK1 et Parkine régularaient par phosphorylation et ubiquitylation les quantités de Miro dans le but d'immobiliser les mitochondries endommagées [Wang *et al.*, 2011]. En effet, ceci permettrait la mise en quarantaine de ces mitochondries avant d'être qu'elles soient dégradées par l'autophagosome. Dans le sens de ces observations, il a été montré que Miro est dégradé dans les conditions où la Parkine

est activée, et que cette dégradation nécessite la présence de niveaux endogènes de PINK1 [Liu *et al.*, 2012]. D'après Birsa *et al.*, cette dégradation de Miro par la Parkine se ferait en l'ubiquitylant sur sa Lys27 [Birsa *et al.*, 2014].

3. Le contrôle de la qualité mitochondriale

a. L'origine

Bien que PINK1 soit localisée à la mitochondrie et Parkine au cytosol, de nombreuses études mettant en jeu des techniques de biologie cellulaire ont montré que la Parkine est recrutée du cytosol vers les mitochondries dépolarisées afin d'initier la dégradation spécifique des organites endommagés par la voie de l'autophagie [Geisler *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2010 ; Narendra *et al.*, 2008 ; Narendra *et al.*, 2010 ; Vives-Bauza *et al.*, 2010]. PINK1 va en effet s'accumuler au niveau des mitochondries dysfonctionnelles, et par son activité kinase, va permettre d'activer la Parkine par un phénomène de dé-autoinhibition (**Paragraphe III.3.c**). Ceci va induire la translocation de la Parkine à la mitochondrie, puis le processus de mitophagie [Geisler *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2010 ; Narendra *et al.*, 2010], suggérant que ces deux protéines jouent ensemble un rôle majeur dans le contrôle de la qualité des mitochondries. Dans ce sens, il est à noter que le recrutement de Parkine dépendant de PINK1 est aboli dans les cellules issues de patients portant des mutations de *PINK1* et *PARK2* [Geisler *et al.*, 2010 ; Geisler *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2010 ; Narendra *et al.*, 2010].

b. Détection des mitochondries endommagées par PINK1

Dans des conditions physiologiques, le précurseur de PINK1 est importé à travers la machinerie d'import TOM, située à la MME, puis à travers le complexe TIM situé à la MMI (**Paragraphe II.4**). Il va ensuite subir un premier clivage par la protéase MPP, comme c'est le cas pour la majorité des protéines reconnues par le récepteur Tom20 [Greene *et al.*, 2012] (**Paragraphe II.4.a**). La protéine est ensuite de nouveau clivée par la protéase PARL (*Presenilin-Associated Rhomboid-Like protein*) [Jin *et al.*, 2010 ; Meissner *et al.*, 2011], au niveau des acides aminés Ala103 et Phe104, générant une protéine de 52 kDa [Deas *et al.*, 2011]. La partie N-

terminale de la protéine est ensuite relarguée dans le cytosol, où la phénylalanine générée en N-terminal est identifiée par l'E3 ubiquitine ligase N-Degron type 2, et dégradée par le système ubiquitine-protéasome [Yamano *et al.*, 2013]. Ces cycles continus d'import/dégradation de PINK1 sont très limités, ce qui explique qu'il est très difficile de détecter les niveaux endogènes de cette protéine au niveau des mitochondries fonctionnelles.

A l'inverse, lorsque l'import à travers les machineries d'import TOM et TIM est défectueux (à cause d'une dépolarisation mitochondriale, de causes génétiques, d'un stress environnemental ou de l'accumulation de protéines mal repliées), le clivage de PINK1 par les protéases MPP et PARL ne peut pas avoir lieu. Le précurseur de PINK1 s'accumule alors à la MME, et plus précisément au niveau du complexe TOM [Bertolin *et al.*, 2013 ; Lazarou *et al.*, 2012]. Ainsi, ce modèle proposant que PINK1 serait un senseur des défauts mitochondriaux explique comment au milieu de mitochondries saines, seules les mitochondries endommagées seraient « marquées » par PINK1.

c. PINK1 phosphoryle la Parkine

Il est acquis depuis 2010 que PINK1 est essentielle pour (1) le recrutement de la Parkine à la mitochondrie et (2) la stimulation de son activité E3 ubiquitine-ligase [Geisler *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2010 ; Narendra *et al.*, 2010 ; Vives-Bauza *et al.*, 2010 ; Ziviani *et al.*, 2010], mais c'est en 2013 que la structure de la protéine a été partiellement résolue par cristallographie [Riley *et al.*, 2013 ; Trempe *et al.*, 2013 ; Wauer *et al.*, 2013]. Ces études structurales ont révélé le mécanisme à la base de l'autoinhibition de la Parkine. La Parkine possède quatre domaines RING0, RING1, IBR et RING2 [Hristova *et al.*, 2009] (**Figure 13**). Seul le domaine RING1 adopte une structure permettant la liaison des E2 ubiquitine-protéines ligases. En effet, comme les autres protéines RBR (*Ring Between Ring*), la Parkine nécessite une activation pour permettre à l'E2 chargée en ubiquitine de se lier au domaine RING1, de transférer l'ubiquitine vers la Cys431 de la Parkine au niveau du domaine RING2 et de permettre au final le transfert de l'ubiquitine à ses substrats [Riley *et al.*, 2013 ; Trempe *et al.*, 2013 ; Wauer *et al.*, 2013]. Lorsqu'elle n'est pas activée, le domaine

RING0 obstrue le site Cys431 au niveau du domaine RING2, et le site de liaison de l'E2 est bloqué par une région nommée « élément répresseur ». A l'inverse, la phosphorylation de la Parkine sur sa Ser65, et la phosphorylation de l'ubiquitine induisent un shift du site de liaison de l'E2 au niveau de la Cys431. Il a ainsi été montré que ce transfert de l'ubiquitine sur cette cystéine peut alors être contrôlé par PINK1 [Lazarou *et al.*, 2013], ou par le mutant phosphomimétique de la Parkine Ser65Glu [Iguchi *et al.*, 2013 ; Kondapalli *et al.*, 2012 ; Shiba-Fukushima *et al.*, 2012].

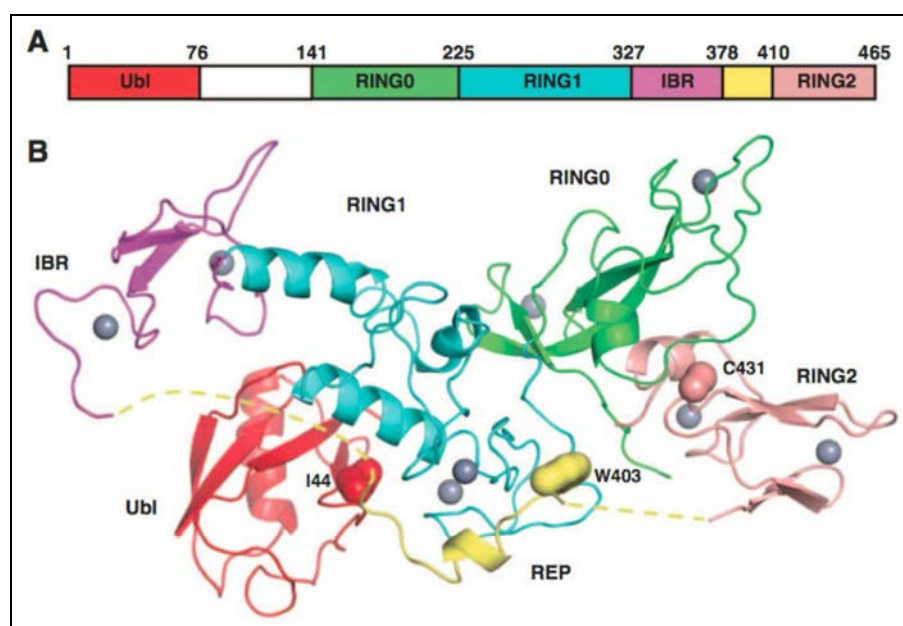


Figure 13 Représentation structurale de la Parkine

(A) Structure primaire et domaines de la Parkine. (B) Dessin représentant la structure tridimensionnelle de la protéine. D'après [Trempe *et al.*, 2013].

Cependant, l'utilisation du mutant phosphomimétique Ser65Glu n'est pas suffisant pour que l'activité catalytique de la Parkine soit totale [Kane *et al.*, 2014 ; Kazlauskaite *et al.*, 2014 ; Koyano *et al.*, 2014]. En effet, celle-ci le devient en présence de PINK1, suggérant l'existence d'autre substrat de PINK1 nécessaire à l'activation complète de la Parkine.

En plus de la Parkine, et de Miro, qui est phosphorylé par PINK1 dans le but d'immobiliser les mitochondries endommagées [Wang *et al.*, 2011], d'autres cibles phosphorylées par PINK1 ont également été identifiées mais ne semblent pas être

directement liées au processus de dégradation des mitochondries dysfonctionnelles par les protéines PINK1 et Parkine. Il s'agit d'Omi/HtrA2, une protéase et TRAP-1 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Protein 1*), une chaperonne [Plun-Favreau *et al.*, 2007 ; Pridgeon *et al.*, 2007]. Il a été montré plus récemment dans d'autres modèles que Omi/HtrA2 n'est pas en aval de la voie PINK1/Parkine et que TRAP-1 compense complètement la déficience en PINK1, mais pas celle en Parkine [Costa *et al.*, 2013 ; Yun *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2013].

d. L'ubiquitine phosphorylée active la Parkine et modifie sa localisation

La Parkine possède une séquence en N-terminal semblable à l'ubiquitine, ainsi qu'une sérine localisée à la même position (Ser65) ; il a donc été logique de vérifier si ce second substrat de PINK1 nécessaire à l'activation de la Parkine était l'ubiquitine. Ainsi, il a été découvert de manière indépendante par trois équipes en mettant en jeu des approches de biochimie que l'ubiquitine est bien phosphorylée par PINK1 au niveau de cette Ser65, et qu'il s'agit de l'étape manquante permettant l'activation optimale de la Parkine [Kane *et al.*, 2014 ; Kazlauskaitė *et al.*, 2014 ; Koyano *et al.*, 2014]. Les auteurs montrent que l'introduction de mutations « phosphomimétiques » (S65D, S65E) dans le domaine UBL de la Parkine et dans l'ubiquitine stimule l'activité de la Parkine, même en absence de PINK1, et que l'ubiquitine phosphorylée agit sur la Parkine pour la rendre catalytiquement active *in vitro*. De manière intéressante, d'autres protéines possédant le même type de domaines UBL, telles que SUMO1 (*Small Ubiquitin-related MOdifier 1*, impliquée dans une modification post-traductionnelle appelée sumoylation), ou ISG15 (*Interferon-Stimulated Gene 15*, impliquée dans le processus d'ISGylation, proche de l'ubiquitylation) ne sont pas phosphorylées par PINK1, ce qui démontre la spécificité des phosphorylations de la Parkine et de l'ubiquitine par PINK1 [Kazlauskaitė *et al.*, 2014 ; Koyano *et al.*, 2014].

En précipitant les chaînes d'ubiquitine, Ordureau *et al.* ont trouvé que PINK1 augmente la phosphorylation de l'ubiquitine sur sa Ser65 au niveau mitochondrial, indiquant que les chaînes d'ubiquitine attachées à la MME sont phosphorylées par PINK1 et servent de récepteurs à la Parkine. En même temps que deux autres

équipes, ces auteurs ont aussi montré que la phospho-ubiquitine se liait beaucoup plus à la Parkine phosphorylée qu'à la Parkine normale, suggérant le modèle suivant : PINK1 phosphoryle la Parkine, puis des chaînes d'ubiquitine se forment, sont phosphorylées par PINK1, ce qui induit le recrutement de la Parkine et l'amplification de sa fonction enzymatique par sa liaison avec les chaînes d'ubiquitine [Okatsu *et al.*, 2015 ; Ordureau *et al.*, 2015 ; Ordureau *et al.*, 2014 ; Shiba-Fukushima *et al.*, 2014] (**Figure 14**).

L'équipe de Komander a de son côté montré que PINK1 phosphorylait toutes les ubiquitines des chaînes d'ubiquitine et que la phosphorylation de la Ser65 de l'ubiquitine altérait sa structure [Wauer *et al.*, 2015]. Par des études de cristallographie, ces mêmes auteurs ont proposé que la liaison de l'ubiquitine phosphorylée conduisait à un changement conformationnel du domaine RING1 de la Parkine, libérant son domaine UBL, ce qui lui permettait d'être phosphorylée par PINK1, et ainsi de l'activer de manière optimale [Wauer *et al.*, 2015].

La surexpression de la Parkine régule également *in vitro* de nombreuses protéines de la MME, incluant Mfn1, Mfn2, mais aussi les canaux voltage dépendant VDAC1 et VDAC3, certains composants de la machinerie TOM (Tom70, Tom40 et Tom20), le facteur pro-apoptotique Bax, ou la GTPase mitochondriale Miro. Le rôle éventuel de ces protéines dans le recrutement de la Parkine reste débattu car *in vivo*, la dégradation de ces protéines de la MME reste incertaine [Chan *et al.*, 2011 ; Gegg *et al.*, 2010 ; Johnson *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011].

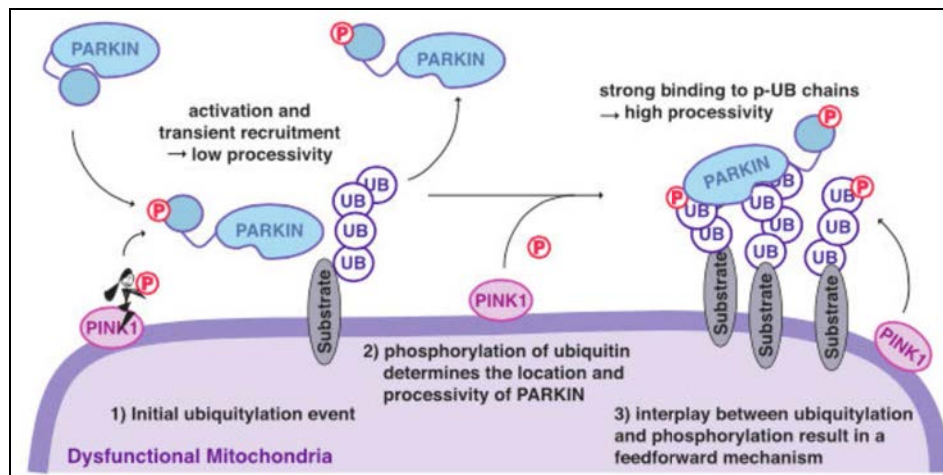


Figure 14 La phosphorylation de l’ubiquitine est essentielle afin de permettre les événements d’ubiquitylation nécessaires à la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles

(1) La phosphorylation de la Parkine au niveau de son domaine UBL par PINK1 induit un changement de conformation de cette protéine, ce qui lui permet de s’activer. La Parkine active ubiquityle ses substrats à la MME. (2) PINK1 phosphoryle les chaînes d’ubiquitine au niveau de leur serine 65. (3) En conséquence, la Parkine se retrouve intimement liée aux chaînes de poly-phospho-ubiquitine, dans une région restreinte et promeut ainsi une ubiquitylation efficace de ses substrats. D’après [Stolz *et al.*, 2014].

e. Quatre mécanismes impliqués dans le paradigme du contrôle de la qualité mitochondriale

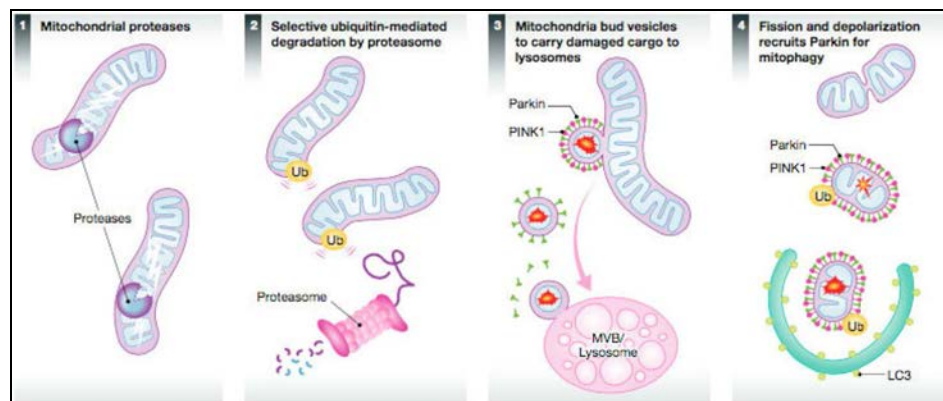


Figure 15 Les quatre voies du contrôle de la qualité mitochondriale

Représentation schématique illustrant la présence de protéases mitochondriales dans la matrice et dans l’espace inter-membranaire, agissant probablement comme une première ligne de défense contre les protéines solubles mal repliées et oxydées. Les protéines de la MME sont éliminées des mitochondries par un processus de rétro-translocation suivi d’une ubiquitylation. La dégradation de ces protéines se termine dans le cytosol par l’action du protéasome. La troisième ligne de défense serait la suppression de différents composants protéiques endommagés à travers la génération de MDVs, qui transitent jusqu’aux endosomes tardifs. C’est seulement lorsque la dysfonction mitochondriale est massive, ou lorsque l’import mitochondrial est compromis que l’organe entier sera dirigé vers l’autophagosome. D’après [Sugiura *et al.*, 2014]

a. Les protéases mitochondriales

Tatsuta *et al.* ont montré en 2009 que des protéases mitochondriales dégradent les protéines mal repliées et oxydées au niveau de la matrice et de l'espace inter-membranaire des mitochondries [Tatsuta *et al.*, 2009]. Chez la levure ces protéases dégradent entre 6 et 12% des protéines par heure, ce qui met en avant ce processus dans le contrôle de la qualité des mitochondries [Augustin *et al.*, 2005]. Egalement, la perte de protéases spécifiques conduit à différentes maladies neurodégénératives, incluant la maladie de Parkinson, avec les protéases mitochondriales DJ-1, Htra2 et PARL, mais aussi les paraplégies spastiques, les ataxies, ou le syndrome de Gilles de la Tourette [Quiros *et al.*, 2015].

β. Dégradation sélective par le système ubiquitine-protéasome

La Parkine, une fois activée, permet l'ubiquitylation de ses substrats et par conséquent, la dégradation de nombreuses protéines de la MME dont les sous-unités Tom20, Tom40 et Tom70 de la machinerie TOM [Chan *et al.*, 2011 ; Sarraf *et al.*, 2013 ; Yoshii *et al.*, 2011] (**Paragraphe III.3.d**). Lors de ce processus, les mitochondries « marquées » par la Parkine vont former des agrégats, et seront transférées à la région péri-nucléaire sous forme de « mito-aggresomes » [Lee *et al.*, 2010 ; Vives-Bauza *et al.*, 2010], qui par leur association avec des composants lysosomaux, sont dégradés par autophagie.

γ. « MDVs » : une nouvelle voie dans le contrôle qualité ?

Une autre fonction de la voie PINK1/Parkine impliquerait la formation de vésicules mitochondriales nommées MDVs (*Mitochondria-Derived Vesicles*). Un stress mitochondrial engendré par un traitement à l'antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire induit la formation de ces vésicules à partir d'un bourgeonnement de membranes des mitochondries, et permettent ainsi le transport de protéines et de lipides endommagés des mitochondries vers d'autres organites. La nature des stress mitochondriaux est importante car la constitution des cargos en est dépendante, ce qui détermine la destination des MDVs. Par exemple lors d'un stress mitochondrial causé par un traitement à l'antimycine A, des MDVs

vont fusionner avec des endosomes tardifs, pour être *in fine* envoyées au lysosome pour dégradation [Soubannier *et al.*, 2012]. Ce type de MDVs dépend des protéines PINK1 et Parkine. Il faut noter que ce phénomène est indépendant d'ATG5 et de LC3, et ne requiert pas de dépolarisation mitochondriale, suggérant que cette nouvelle voie est un complément du processus de mitophagie [Soubannier *et al.*, 2012 ; Soubannier *et al.*, 2012].

A l'inverse, d'autres MDVs contenant la protéine MAPL, une protéine ligase ancrée à la MME, ne contiennent jamais le récepteur Tom20 et ces MDVs sont dirigées vers les peroxysomes et ne sont pas en lien avec la voie PINK1/Parkine [Neuspiel *et al.*, 2008].

δ. Mitophagie

Il semble clair que l'attachement des chaînes d'ubiquitine aux protéines mitochondriales par la Parkine est à l'origine du processus de mitophagie, comme cela a déjà été observé pour d'autres substrats de l'autophagie [Kirkin *et al.*, 2009]. Tout comme l'autophagie induite par privation de nutriments, la mitophagie implique le recrutement à la mitochondrie de trois composants permettant le ciblage des mitochondries par l'autophagosome : ULK1, Atg9 et LC3 [Itakura *et al.*, 2012]. On ne sait cependant pas encore comment ces composants sont recrutés, même s'il est possible que des protéines adaptatrices, comme p62, NBR1, NDP52, TaxBP1 et l'optineurine pourraient jouer ce rôle de par leur capacité à s'associer à la fois aux chaînes d'ubiquitine et à la protéine LC3. En effet, Lazarou *et al.* proposent que NDP52 et l'optineurine seraient des récepteurs primaires pour initier la mitophagie PINK1- et Parkine-dépendante. Cependant, PINK1 permet leur recrutement à la mitochondrie afin d'activer directement la mitophagie [Lazarou *et al.*, 2015]. A la mitochondrie, NDP52 et l'optineurine recruteraient les facteurs clé de l'autophagie ULK1, DFCP1 et WIPI1. Ceci soutient l'idée que la phosphorylation de l'ubiquitine par PINK1 serait le signal permettant la mitophagie, et que la Parkine agirait en tant qu'amplificateur de signal.

De plus, on commence à comprendre comment la génération des membranes de l'autophagosome se limite à entourer avec précision les mitochondries

endommagées. Il a en effet été montré que lors d'un stress oxydant, la petite GTPase Rheb est aussi recrutée au niveau de la MME, et que son recrutement permet la dégradation des mitochondries par mitophagie, *via* une interaction physique avec le récepteur mitochondrial NIX1 et avec la protéine de l'autophagosome LC3 [Melser *et al.*, 2013]. Egalement, la protéine pro-fission Fis1 de la MME lie les RabGAPs (*GTPase-activating protein*) TBC1D15 et TBC1D17, afin de contrôler le développement de membrane LC3-positive pour générer l'autophagosome autour des mitochondries endommagées [Onoue *et al.*, 2013]. Le knockout de Fis1 ou de ces deux RabGAPs conduit à une augmentation excessive de membranes autophagosomales positives pour LC3 lors d'une mitophagie dépendante de la Parkine [Yamano *et al.*, 2014].

Il existerait également des liens forts entre les mécanismes de fission mitochondriale et de mitophagie. Chez la levure, l'homologue de Drp1 est requis pour certaines formes de mitophagie [Abeliovich *et al.*, 2013 ; Frank *et al.*, 2012 ; Mao *et al.*, 2013]. Ceci conduit au modèle proposant que la fragmentation mitochondriale pourrait faciliter leur absorption [Buhlman *et al.*, 2014 ; Tanaka *et al.*, 2010], ce qui serait en accord avec le fait que les phénotypes observés chez les drosophiles *PINK1* et *PARK2* sont annulés en promouvant la fission mitochondriale [Deng *et al.*, 2008 ; Poole *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2008]. Dans ce sens, il a été montré que *PINK1* et Parkine peuvent éliminer des composants mitochondriaux spécifiques [McLelland *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2013].

De manière intéressante, il a récemment été montré que l'enzyme de deubiquitylation USP8 permettait d'éliminer les chaînes d'ubiquitine liées aux lysines 6 de la Parkine, un processus clé à son recrutement mitochondrial et au processus de mitophagie qui en suit [Durcan *et al.*, 2014]. Il a également été montré que les enzymes de deubiquitylation UPS15 et UPS30 pouvaient s'opposer à l'ubiquitylation des protéines de la MME par la Parkine, ce qui ralentissait la clairance des mitochondries endommagées [Bingol *et al.*, 2014 ; Cornelissen *et al.*, 2014] (**Figure 16**). Cependant, à la différence d'USP8, USP15 et USP30 n'affectent pas l'ubiquitylation de la Parkine, ni son recrutement mitochondrial.

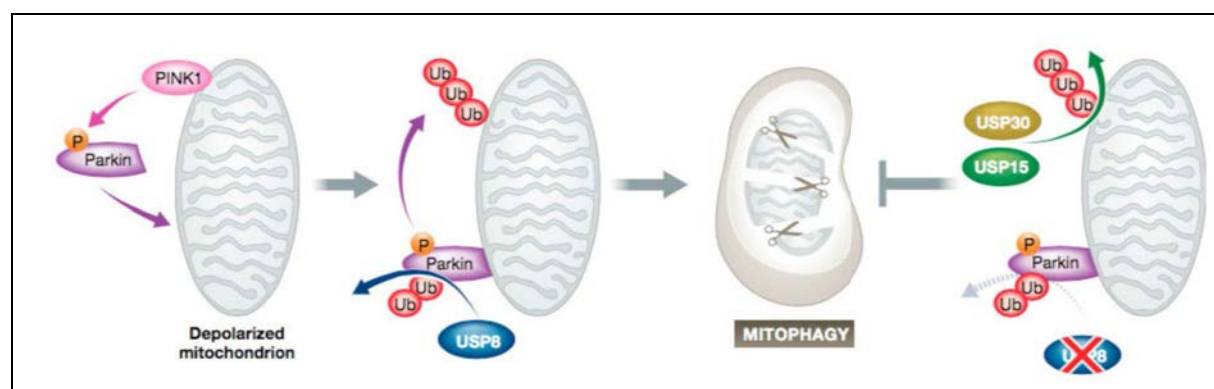


Figure 16 La clairance des mitochondries endommagées et dépolariées par mitophagie est régulée par les deubiquitylases USP8, USP15 et USP30

D'après [Dikic *et al.*, 2014].

4. La biogenèse mitochondriale

La Parkine ne joue pas uniquement un rôle dans la dégradation des composants mitochondriaux, ou de l'organite entier. Elle serait aussi impliquée dans la régulation du processus de biogenèse mitochondriale. En effet, il a été montré par chromatographie d'affinité puis par co-immunoprécipitation que la Parkine s'associerait au facteur de transcription mitochondrial Tfam, ce qui améliorerait la transcription des protéines mitochondriales contrôlées par Tfam et ainsi la biogenèse mitochondriale [Kuroda *et al.*, 2006] (**Paragraphe II.7.b**). Dans ce sens, les mutations du gène *PARK2* aboliraient l'interaction de la Parkine avec Tfam [Kuroda *et al.*, 2006 ; Rothfuss *et al.*, 2009]. Ces résultats restent cependant surprenants car la Parkine est cytoplasmique et Tfam mitochondrial.

Une étude plus récente a montré que la Parkine réprime par ubiquitylation son substrat PARIS (*Parkin Interacting Substrate*, ZNF746), qui est un répresseur transcriptionnel de PGC-1 α , le régulateur clé du processus de biogenèse mitochondriale [Shin *et al.*, 2011] (**Figure 17**). Dans ce papier, les auteurs montrent que la surexpression de PARIS chez la souris conduisait à une diminution de 40% du nombre de neurones dopaminergiques et que la co-surexpression de Parkine et PGC-1 α prévenait cet effet, indiquant que la surexpression de PARIS est suffisante pour *down*-réguler PGC-1 α , et tuer les neurones dopaminergiques par un mécanisme dépendant de PGC-1 α .

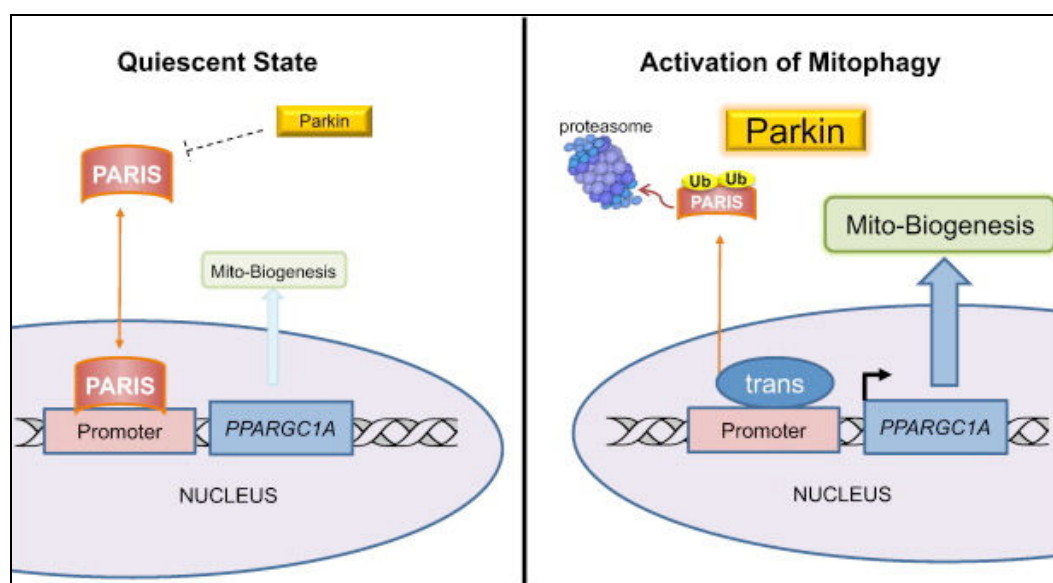


Figure 17 L'axe Parkine-PARIS contrôle la biogenèse mitochondriale

En conditions normales, l'homéostasie cellulaire est caractérisée par une balance entre dégradation et biogenèse mitochondriale. Ceci permet de maintenir l'intégrité du réseau mitochondrial. Une des voies permettant cette coordination est la voie Parkine-PARIS. Le déclenchement de la mitophagy augmente l'expression mitochondriale de la Parkine ainsi que son activité, induisant une dégradation de PARIS. PARIS étant un répresseur de PGC-1 α (PPARGC1A), inhiber PARIS conduit à une augmentation de la transcription de PGC-1 α , permettant d'activer la biogenèse mitochondriale. D'après [Andres *et al.*, 2015].

Dés études très récentes chez la drosophile montrent également que les protéines PINK1 et Parkine contrôleraient la traduction locale de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale codées par le génome nucléaire (nRCC, *nuclear-encoded Respiratory Chain Complex*) au niveau de la MME, à différents niveaux. Ces nRCC sont de base réprimés, et localisés par l'intermédiaire de PINK1 et Tom20 à la MME. C'est à ce niveau qu'ils vont être dérprimés et activés par PINK1 et Parkine à travers le recrutement de répresseurs de la traduction, comme Glorund/hnRNPF (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein F*). Ce répresseur est un substrat de la Parkine et permet d'améliorer la liaison d'activateur, comme le composant du complexe d'initiation de la transcription, eIF4G (*Eukaryotic translation initiation Factor 4 G*). Ainsi, inhiber la traduction de ce répresseur favoriserait la traduction de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale, et compenserait les phénotypes observés chez les drosophiles déficientes en PINK1. L'inhibition d'eIF4G a quant à lui l'effet inverse [Gehrke *et al.*, 2015].

IV. Remarques et conclusions

1. Biogenèse *versus* import mitochondrial

Comme exposé ci-dessus, de nombreuses études réalisées dans différents modèles cellulaires et avec différents protocoles ont permis de mettre en avant une implication majeure des protéines PINK1 et Parkine dans la régulation d'une pléthore de fonctions mitochondriales ; fonctions incluant les processus de fission/fusion mitochondriales, de transport le long du cytosquelette, de contrôle de la qualité des mitochondries, et de biogenèse. Or, pour être effective, la biogenèse mitochondriale requiert une coordination fine entre la synthèse et l'import d'environ 1000-1500 protéines codées par le génome nucléaire et synthétisées par les ribosomes dans le cytosol [Baker *et al.*, 2007]. Compte tenu de la localisation de Parkine et de PINK1 au niveau de la machinerie TOM, il n'est donc pas illogique de penser que ces protéines pourraient aussi jouer un rôle dans le contrôle de l'import de ces protéines mitochondriales [Bertolin *et al.*, 2013 ; Lazarou *et al.*, 2012].

2. PINK1, Parkine, mitophagie : qu'en est-il dans les neurones ?

La compréhension des mécanismes permettant le recrutement mitochondrial de Parkine ainsi que le processus de mitophagie qui en suit est très majoritairement basée sur des études réalisées dans les cellules de mammifères (immortalisées et non-neuronales dans la majorité des cas). C'est en effet par le comptage de cellules exprimant ou non des marqueurs spécifiques de la MME (tels que Tom20) que la mitophagie a principalement été étudiée. Or, cette approche ne permet pas de différencier les phénomènes de dégradation mettant en jeu le système ubiquitine-protéasome et la voie de l'autophagie [Yoshii *et al.*, 2011]. Elle a été complétée par l'étude de marqueurs de la MMI et de la matrice, qui sont des meilleurs marqueurs pour l'étude de la mitophagie que les protéines de la MME car ils ne sont pas dégradés par le système ubiquitine-protéasome. Bien que simple et solide, cette approche a permis d'identifier des effets massifs mais uniquement sur des cellules possédant des taux élevés de Parkine et traitées par le CCCP, la valinomycine ou la roténone [Grenier *et al.*, 2013]. Elle ne semble cependant pas assez sensible pour

permettre l'identification d'un phénomène local de mitophagie, sur des cellules plus sensibles, comme cela peut être le cas dans les neurones.

En effet, la transposition de ces mécanismes aux neurones a longtemps été controversée, probablement dû au fait de la faible sensibilité des approches. Cependant, en mettant en jeu d'autres techniques, des études récentes ont confirmé l'implication de PINK1 et Parkine à différents niveaux dans ce modèle, plus pertinent pour la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Cai *et al.* ont par exemple montré que lors d'un traitement au CCCP, des mitochondries « marquées » par la Parkine s'accumulent dans les régions somato-dendritiques de neurones corticaux, où les lysosomes matures sont localisés [Cai *et al.*, 2012]. Ils montrent également par imagerie en temps réel que des mitochondries « marquées » simultanément pour la Parkine et pour LC3 disparaissent avec le temps et que cet effet n'est pas retrouvé en absence de Parkine. Ashrafi *et al.* ont de leur côté utilisé la sonde « mito-KillerRed », une protéine fluorescente capable de générer des radicaux libres lorsqu'elle est irradiée par une lumière verte afin d'endommager des mitochondries d'axones d'hippocampes. Dans ces conditions, ils ont observé la formation d'autophagosomes ainsi que le recrutement de lysosomes au niveau de ces mitochondries, de manière dépendante de Parkine et PINK1 [Ashrafi *et al.*, 2014]. Ce recrutement de lysosomes au niveau mitochondrial a également été observé dans des cultures primaires de neurones par l'utilisation de la sonde « mito-Keima », une protéine qui émet une fluorescence différente en fonction du pH, et qui peut ainsi permettre de mettre en évidence une fusion lysosomale du au pH très acide de ces organites [Bingol *et al.*, 2014].

3. Conclusion

Notre connaissance actuelle des activités de la voie PINK1/Parkine n'est seulement que la partie visible de l'iceberg. Nous possédons aujourd'hui de très nombreux points de vue quant aux possibles fonctions mitochondriales contrôlées par ces protéines. Cependant, les mécanismes moléculaires liant ces fonctions au sein d'une même cellule, et l'impact général de cette voie en terme de substrats, de dynamique de temps et d'espace, reste largement incompris. Des études

supplémentaires sont alors requises afin de continuer à gagner en clarté sur ces aspects, dans le but de comprendre l'intégration générale de toutes ces fonctions dans un même système. Ces études permettraient ainsi de comprendre les conséquences générales des dysfonctions de PINK1 et Parkine sur la mitochondries, mais aussi sur la cellules, ainsi que leur pertinence pour les formes autosomiques, et sporadiques, de maladies de Parkinson.

Chapitre 2 : Préface et objectifs

Préface

J'ai initié mon doctorat dans l'équipe « Base moléculaires, physiopathologie et traitement des maladies neurodégénératives » dirigé par le Professeur Alexis Brice en octobre 2012, avec comme objectif d'étudier les mécanismes moléculaires sous-tendant la régulation de l'homéostasie mitochondriale par les protéines Parkine et PINK1 dans la sous équipe dirigée par le Docteur Olga Corti.

Ce groupe avait montré dès 2003 qu'une fraction de la Parkine s'associait à la MME, suggérant un rôle dans l'ubiquitylation de protéines adressées ou associées à la mitochondrie [Darios *et al.*, 2003]. L'identification d'un substrat mitochondrial de la Parkine par l'analyse protéomique différentielle d'un modèle murin déficient en Parkine, l'enzyme matricielle HSD17 β 10 (*3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2*) [Periquet *et al.*, 2003], a par la suite conduit l'équipe à explorer les interactions mises en jeu par cette E3 ubiquitine-protéine ligase à la MME.

Grâce à l'utilisation de la technique d'imagerie de type FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) pour étudier des interactions moléculaires localement *in cellulo*, l'association de Parkine, PINK1 et HSD17 β 10 à proximité de la machinerie TOM (*Translocase of the Outer Mitochondrial membrane*) était en cours d'étude lors de conditions de blocage de l'import. Cette machinerie est impliquée dans la translocation des protéines codées par le génome nucléaire et adressées à l'organite, qui constituent la très grande majorité des protéines mitochondriales. En parallèle, il avait été montré par des approches de biochimie que la Parkine facilitait l'adressage mitochondrial d'HSD17 β 10 et de PINK1. L'ensemble de ces observations suggérait que la Parkine pourrait moduler le processus d'import dépendant de TOM par des mécanismes qui restaient à identifier.

D'autres développements très récents de l'équipe suggéraient que la dégradation de sous-unités spécifiques du complexe TOM avec l'intervention de la Parkine et de PINK1 pourrait jouer un rôle dans l'initiation du programme de dégradation de

mitochondries dépolariées, qui impliquerait deux phases successives, la protéolyse de la MMI, suivie de la dégradation d'organites entiers, comme suggéré par Yoshii *et al.* et Chan *et al.* en 2011 [Chan *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011] (**Chapitre 4, I.1**).

Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous émettons l'hypothèse qu'au sein de la voie « PINK1/Parkine », la machinerie TOM assurerait le couplage du processus d'import aux mécanismes de contrôle de la qualité de la mitochondrie. Différents paliers de régulation de cette qualité seraient mis en jeu en fonction du degré de défaillance des organites : (1) la facilitation de l'import des protéines mitochondriales ; (2) la protéolyse de composants spécifiques de MME dont les sous-unités des machineries TOM, et la clairance mitochondriale ; (3) le déclenchement du programme de biogénèse mitochondriale.

Sur la base de ces observations et du contexte international en 2012, j'ai débuté mon travail de thèse avec les objectifs suivants :

Axe I. PINK1, Parkine et la machinerie d'import TOM

1. Etudier le rôle de la machinerie d'import TOM, comme interrupteur moléculaire couplant l'import mitochondrial au processus de dégradation des mitochondries.
2. Etudier le rôle de la Parkine dans la facilitation de l'adressage mitochondrial de son substrat HSD17 β 10 à travers la machinerie TOM.
3. Etudier le rôle plus large de la Parkine sur l'import mitochondrial des protéines importées par la voie « Tom20 » de la machinerie TOM.

Axe II. Clairance mitochondriale : entre régulation et couplage

1. Etudier l'implication de la protéine Vps13C dans la mitophagie dépendante des protéines PINK1 et Parkine.
2. Etudier de manière intégrée le couplage entre la mitophagie, la biogénèse mitochondriale et d'autres programmes protecteurs en réponse au stress mitochondrial dans les neurones.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes supplémentaires

Dissection et mise en culture des neurones corticaux

Les cortex d'embryons de souris ont été disséqués à E14 dans du HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*). Les neurones ont été dissociés par pipetage mécanique et mis en culture dans des flasques, dans des puits ou sur des lamelles en verres enduites au préalable pendant une nuit à 37°C avec de la Poly-D-Lysine (PDL) à la concentration de 250 µg/ml (Sigma, P7886). La mise en culture a été réalisée dans du milieu *Neurobasal A Medium* (ThermoFisher Scientific, 10888022) complémenté en L-Glutamine 1 % (ThermoFisher Scientific, 25030024), Pénicilline-Streptomycine 1 % (ThermoFisher Scientific, 15070063), FBS (*fetal bovin serum*) 2 % (ThermoFisher Scientific, 10270106) et B-27 1X (ThermoFisher Scientific, 17504044) à 37°C, dans une atmosphère enrichie à 5 en % CO₂.

Traitements et siRNA

Pour les expériences nécessitant un traitement par le CCCP (cyanure de carbonyl *m*-chlorophenyl hydrazone, Sigma, C2759), celui-ci a été réalisé après 6 jours de mise en culture à une concentration de 10 µM, sans renouvellement au cours du temps. Du DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma, D8418), le solvant du CCCP, a été ajouté dans le milieu de culture des cellules contrôles n'ayant pas de traitement. Les traitements par les petits ARNs interférents (siARN) ont été réalisés 24 heures avant les traitements au CCCP. Les ARNs interférents ont été transfectés à une concentration de 20 nM suivant les données du fournisseur avec le kit Lipofectamine RNAiMAX Reagent (ThermoFisher Scientific, 13778150). Les petits ARN interférents suivants ont été utilisés: siARN contrôle (Qiagen, 102728), siARN *PARIS* (Qiagen, GS69228), siARN *hnRNP-F* (Qiagen, GS98758) et siARN *ATG7* (Qiagen, GS74244).

Immunocytochimie et microscopie confocale

Pour les expériences d'immunocytochimie, les neurones ont étéensemencés à une densité de 70 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits contenant des

lamelles en verre de 12 mm de diamètre (Fisher Scientific, 11708701) enduites avec de la PDL. Après 7 jours de culture, les cellules ont été fixées avec de la formaldéhyde à une concentration de 4 % pendant 20 minutes (Sigma, 252549). Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du PSB-Triton X-100 (0,2 %) dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante, lavées avec du PBS, les sites aspécifiques ont été bloquée 1 heure à 4°C avec du PBS-NGS 10 % (*Normal Goat Serum*, ThermoFisher Scientific, 1610064), puis les anticorps primaires puis secondaires dilués dans du PBS-NGS 2 % ont été incubés pendant 45 minutes à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames en verre avec du milieu de montage ProLong® Gold Antifade Reagent (ThermoFisher Scientific, P36930). Les images ont été réalisées grâce à un microscope confocal droit Olympus FluoView FV-1000 équipé du logiciel Olympus FV-1000 3.1 et un objectif à huile 60X.

Les anticorps ou produits pharmacologiques utilisés sont les suivants : anticorps primaires anti-Parkine (Millipore, AB5112), anti-PINK1 (Novus, BC100-494), anti-MPP β (Proteintech, 16064-1-AP), anti-Tom40 (Santa Cruz, sc-11414), anti-cytochrome c (BD bioscience, 556432), anti-Tom70 (Abcam, ab106193), anti tubuline- α (Abcam, ab7291), anti-Tuj1 (Covance, MRB-435P) ; anticorps secondaires Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, A11029) et Alexa Fluor 568 (ThermoFisher Scientific, A11036) ; Hoechst (Immunochemistry, 33342#14B36).

Les analyses de co-localisation ont été réalisées *via* l'utilisation du Coefficient de Manders et du logiciel ImageJ (NIH, plugin JACoP). Les analyses de FRET ont également été réalisées avec le microscope confocal droit Olympus FluoView FV-1000 équipé du logiciel Olympus FV-1000 3.1. Cette technique est basée sur la mesure du changement d'intensité de fluorescence d'une molécule «donneur» après photoblanchiment d'une molécule «accepteur» se trouvant en étroite proximité ; la suppression de l'«accepteur» abolit le transfert d'énergie entre ces molécules, induisant une augmentation de la fluorescence du «donneur» uniquement si la distance entre l'«accepteur» et le «donneur» ne dépasse pas 10 nm (**Figure 18**). Nous avons donc cherché à mettre en évidence un transfert d'énergie entre des couples «accepteur/donneur» après un marquage en immunofluorescence des

protéines endogènes à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes adaptés. Les acquisitions de la fluorescence du « donneur » et de l'«accepteur» pour le FRET ont été obtenues après excitation à 495 nm ou à 578 nm et le photoblanchiment de l'accepteur a été réalisé par excitation d'une région d'intérêt à 578 nm à l'aide d'un laser à puissance maximale. Les mesures de FRET ont été obtenues avec la fonction «mean» du logiciel ImageJ, et la quantification du transfert d'énergie (% FRET) a été calculée au niveau de la zone d'intérêt par l'équation suivante (I= intensité, D = donneur, PB = photoblanchiment).

$$\%FRET (E) = \frac{I_D \text{ après PB} - I_D \text{ avant PB}}{I_D \text{ après PB}}$$

I_D après PB

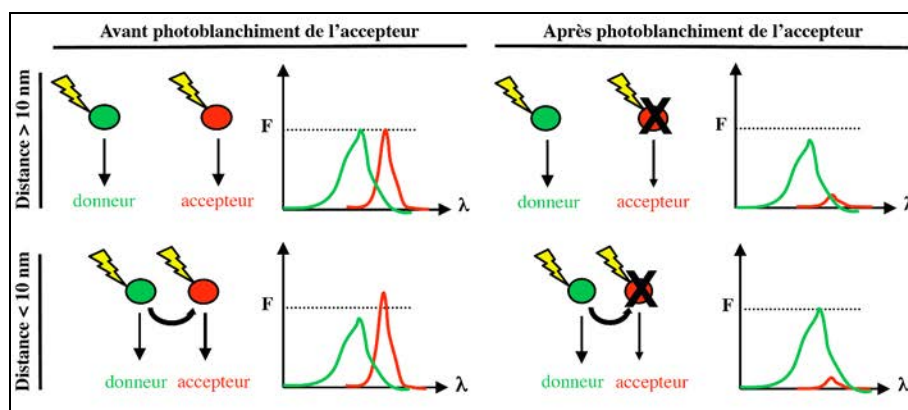


Figure 18 Technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur

Lorsqu'un couple de protéines fluorescentes (exogènes) ou immunomarquées par des anticorps couplés à des fluorochromes adaptés se trouvent en étroite proximité, un transfert d'énergie non radiatif se fait du « donneur » vers l' « accepteur ». Après photoblanchiment de l' « accepteur », cette énergie conservée par le « donneur » peut être mesurée en termes d'augmentation de son intensité de fluorescence. Si les protéines sont éloignées, ce transfert d'énergie n'a pas lieu et la fluorescence du « donneur » reste inchangée après destruction de l' « accepteur ».

Les analyses de surface de cellulaires occupées par les différents marquages mitochondriaux ont été réalisées avec le logiciel ImageJ. Afin d'éliminer le bruit de fond, chaque image a été dupliquée (image **a** et **b**). L'image **b** a été floutée à l'aide du filtre «Gaussian blur», puis cette image a été soustraite à l'image **a**.

RT-PCR quantitatives

Pour l'étude de l'expression génique, les ARN totaux ont été isolés à partir de cultures de neurones corticaux murins (5 000 000 cellules par condition) par l'utilisation du kit RNeasy plus Mini Kit (Qiagen, 74134), puis été dosés avec le Nanodrop ; leur pureté a été évaluée par l'étude du ratio des absorbances optiques à 260 et 280 nm. L'ARN (500 ng) a été rétro-transcrit afin d'obtenir de l'ADNc (*iScript cDNA Synthesis*, Bio-Rad, 1708891). Les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées sur des plaques de 1536 puits avec le système LightCycler 1536 (Roche Applied Science) et le kit LightCycler 1536 DNA Green Master (Roche, 05573092001) en collaboration avec la plateforme de génétique iSeqGen de l'ICM. Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler 1536 1.5 quantification. Le gène *PPIA* a été utilisé en tant que gène de ménage (**Annexe 1**)

Western Blot

Pour l'obtention des fractions totales, les 5 000 000 cellules par condition ont été lysées dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, d'inhibiteurs de phosphatase et de protéases (ThermoFisher Scientific, 78440), à pH 7.0 pendant 30 minutes à 4°C, puis centrifugés à 13 000 rpm afin d'obtenir des extraits de protéines totales. Les quantité de protéines extraites ont été dosées par spectrophotométrie à 562 nm en utilisant le kit *PierceTM BCA protein Assay kit* (ThermoFisher Scientific, 23225). Les extraits protéiques ont migré sur un gel d'acrylamide (Bio-Rad, 4561094), puis ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après vérification du transfert par marquage de la membrane au rouge ponceau, les sites de liaisons non spécifiques ont été saturés avec une solution de PBS/Tween 0.1 %/lait 5 % pendant 1 heure à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire, lavée, puis de nouveau incubée pendant 1 heure en présence de l'anticorps secondaire. La révélation des protéines d'intérêt a été réalisée par l'utilisation d'anticorps fluorescents ou par chimiluminescence. Les niveaux de fluorescence ont été mesurés et quantifiés par le système Odyssey Imaging (Li-COR) ; les niveaux de chimiluminescence ont été détectés sur film (ECL,

Amersham Hyperfilm) ou par l'utilisation du Chemidoc touch Imaging System (Bio-Rad) et quantifiés à l'aide des logiciels Image Lab (Bio-Rad) ou ImageJ. L' α -tubuline a été utilisée comme marqueur de charge.

Les anticorps utilisés sont les suivants : anticorps primaires anti-NRF1 (Abcam, ab55744), anti-hnRNP-F (Abcam, ab50982), anti-tubuline- α (Abcam, ab7291/ab18251), anti-PGC-1 α (Abcam, ab54481), anti-Atg7 (Abcam, Ab53255) ; anticorps secondaires liés à la peroxydase de raifort (HRP) (Jackson ImmunoResearch, 115-035-146 (souris) / 111-035-144 (lapin)) ; anticorps secondaires fluorescents (Li-Cor, 926-32211 (IRDye 800CW, souris) / 926-32210 (IRDye 800CW, lapin) / 26-68071 (IRDye 680RD, souris) / 926-68070 (IRDye 680RD, lapin)).

xCELLigence

Le système xCELLigence, permettant de mesurer des changements d'impédance électriques, calculés en tant que paramètre sans unité nommé Cell-Index, a été utilisé suivant les recommandations du fabricant (*Roche Applied Science* et *ACEA Biosciences*). Les neurones (25 000 par puits) ont étéensemencés sur des plaques 16 puits (E-plates16, Ozyme, 5469830001) possédant un fond en verre recouvert d'électrodes en or. Les cellules ont été transfectées après 4 jours de mise en culture, puis traitées le lendemain par le CCCP. Les valeurs d'impédance ont été mesurées immédiatement après traitement pendant 60 heures, avec une mesure toutes les 15 minutes.

Chapitre 4 : Résultats

La première partie des résultats contient le corps de l'Article 1 (publié en 2013) de l'Article 2 (publié en 2015) et de l'Article 3 (soumis).

La seconde partie des résultats contient le corps de l'Article 4 (publié en 2016) et de l'Article 5 (en préparation).

I.1. La machinerie TOM et la mitophagie Parkine-dépendante

Article 1 : **The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance.** (Autophagy. 2013 Nov 1;9(11):1801-17)

Comme mentionné dans la partie introductive, plusieurs équipes et en particulier celle de Richard Youle (Etats-Unis) et de Keiji Tanaka (Japon) ont montré entre 2010 et 2012 que lorsque le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi^{\text{mit}}$) était dissipé par le protonophore CCCP, PINK1 était stabilisée à la mitochondrie, recrutait la Parkine, ce qui induisait la mitophagie [Geisler *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2010 ; Narendra *et al.*, 2010]. Or, la localisation précise de ce recrutement de Parkine à la MME n'était pas encore identifiée, alors même que l'implication de protéines de la MME était discutée [Geisler *et al.*, 2010 ; Narendra *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2012].

Le fait que PINK1 soit importée dans la mitochondrie par la machinerie TOM, et qu'une diminution du $\Delta\Psi^{\text{mit}}$ conduise à une diminution de l'efficacité d'import mitochondrial laissait raisonnablement penser que le recrutement de PINK1 et de Parkine pourrait avoir lieu au niveau de cette machinerie.

En effet, dans ce papier nous confirmons tout d'abord que différentes conditions conduisant au blocage de l'import résultent en un recrutement mitochondrial de la Parkine, et en particulier dans les cellules HEK293T où j'ai montré qu'une *down*-régulation du récepteur Tom40 induit une diminution des quantités mitochondriales d'une GFP ciblant cet organelle, et *in fine* un recrutement de la Parkine. Par la technique de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), permettant l'étude d'interactions protéiques *in cellulo*, nous montrons dans ces conditions que ce recrutement se fait spécifiquement au niveau de la machinerie TOM. Les proximités moléculaires détectées entre la Parkine et des sous-unités spécifiques de la machinerie TOM (Tom70, Tom40) sont atténuées par des mutations du gène *PARK2* retrouvée chez des patients.

Il était connu que les composants de la machinerie TOM sont les premières protéines à être dégradées lors d'un stress mitochondrial, principalement par l'intermédiaire du système ubiquitine-protéasome [Chan *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011]. Au cours de cette étude, j'ai démontré que la dégradation des composants de cette machinerie, tout particulièrement de la sous-unité structurale Tom22 et du canal Tom40 mimée par des approches d'interférence à l'ARN, suffit à déclencher la dégradation de protéines de la MME et de l'espace inter-membranaire dans des cellules traitées au CCCP, en absence de Parkine. La Parkine reste cependant nécessaire à la dégradation de l'organite entier, alors qu'inversement PINK1 ne l'est pas. Par cette observation, nous avons pu proposer que la dégradation du complexe TOM court-circuiterait l'effet Parkine, et par conséquent qu'il s'agirait d'une étape située en aval de PINK1 dans le processus de mitophagie.

A l'aide d'une méthode d'étude de la mitophagie plus quantitative, basée sur l'analyse de l'aire occupée par un marquage mitochondrial, et de l'étude de l'émergence de vésicule LC3 positive associées aux mitochondries, nous montrons également que la dégradation du canal Tom40 de la machinerie TOM est suffisant pour permettre une dégradation de l'organite entier, en présence de Parkine endogène, et sans traitement au CCCP.

Ensemble, ces résultats placent la machinerie TOM en tant qu'interrupteur moléculaire de la voie PINK1/Parkine, couplant la perte de l'efficacité d'import mitochondrial à l'initiation de la dégradation mitochondriale et nous proposons que la dysfonction de cette fonction du contrôle de la qualité mitochondriale pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des formes autosomiques récessives de la maladie de Parkinson.

The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance

Giulia Bertolin,^{1,2,3} Rosa Ferrando-Miguel,^{1,2,3} Maxime Jacoupy,^{1,2,3} Sabine Traver,^{1,2,3} Karl Grenier,⁴ Andrew W Greene,⁴ Aurélien Dauphin,^{1,2,3,5} François Waharte,⁶ Aurélien Bayot,⁷ Jean Salamero,⁶ Anne Lombès,^{8,9,10} Anne-Laure Bulteau,^{1,2,3} Edward A Fon,⁴ Alexis Brice,^{1,2,3,11} and Olga Corti^{1,2,3,*}

¹Inserm; U 975; CRICM; Hôpital de la Pitié-Salpêtrière; Paris, France; ²UPMC; Université Paris 06; UMR_S975; Paris, France; ³CNRS; UMR 7225; Paris, France; ⁴McGill Parkinson Program; Department of Neurology and Neurosurgery; Montreal Neurological Institute; McGill University; Montreal, Quebec, Canada; ⁵Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière; Paris, France; ⁶CNRS; UMR 144; Institut Curie; Paris, France; ⁷Inserm; U 676; CHU Robert Debré; Paris, France; ⁸Inserm; U 1016; Institut Cochin; Paris, France; ⁹CNRS; UMR 8104; Paris, France; ¹⁰Université Paris 05; UMR_S1016; Paris, France; ¹¹AP-HP; Hôpital de la Pitié-Salpêtrière; Department of Genetics and Cytogenetics; Paris, France

Keywords: Parkinson disease, mitochondria, outer mitochondrial membrane, mitophagy, PARK2, PINK1, TOMM machinery

Abbreviations: ACTA1, actin, alpha 1, skeletal muscle; AMBRA1, autophagy/Beclin 1 regulator 1; ATG, autophagy-related; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; CYCS, cytochrome c, somatic; Dox, doxycycline; dsRed, red fluorescent protein from *Discosoma*; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione-S-transferase; HSD17B10, hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha; LONP1, lon peptidase 1, mitochondrial; PARK2, parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase (parkin); PINK1, PTEN-induced putative kinase 1; PMPCB, peptidase (mitochondrial processing) beta; TOMM, translocase of outer mitochondrial membrane; VDAC1, voltage-dependent anion channel 1

Loss-of-function mutations in *PARK2/PARKIN* and *PINK1* cause early-onset autosomal recessive Parkinson disease (PD). The cytosolic E3 ubiquitin-protein ligase PARK2 cooperates with the mitochondrial kinase PINK1 to maintain mitochondrial quality. A loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$) leads to the PINK1-dependent recruitment of PARK2 to the outer mitochondrial membrane (OMM), followed by the ubiquitination and proteasome-dependent degradation of OMM proteins, and by the autophagy-dependent clearance of mitochondrial remnants. We showed here that blockade of mitochondrial protein import triggers the recruitment of PARK2, by PINK1, to the TOMM machinery. PD-causing *PARK2* mutations weakened or disrupted the molecular interaction between PARK2 and specific TOMM subunits: the surface receptor, TOMM70A, and the channel protein, TOMM40. The downregulation of TOMM40 or its associated core subunit, TOMM22, was sufficient to trigger OMM protein clearance in the absence of PINK1 or PARK2. However, PARK2 was required to promote the degradation of whole organelles by autophagy. Furthermore, the overproduction of TOMM22 or TOMM40 reversed mitochondrial clearance promoted by PINK1 and PARK2 after $\Delta\Psi$ loss. These results indicated that the TOMM machinery is a key molecular switch in the mitochondrial clearance program controlled by the PINK1-PARK2 pathway. Loss of functional coupling between mitochondrial protein import and the neuroprotective degradation of dysfunctional mitochondria may therefore be a primary pathogenic mechanism in autosomal recessive PD.

Introduction

Parkinson disease (PD) is a frequent neurodegenerative disease and the most common movement disorder. It is in most cases sporadic, but nearly 10% of the cases are caused by mutations in genes with autosomal dominant or recessive inheritance. At least seven of these genes have been identified; the *PARK2* and *PINK1* genes, encoding the cytosolic E3 ubiquitin-protein ligase, PARK2, and the mitochondrial kinase, PINK1, account for clinically similar early-onset autosomal recessive forms of PD.¹

There is growing evidence that mitochondrial dysfunction plays a central role in the pathogenesis of autosomal recessive PD. Genetic studies in *Drosophila* demonstrate that *PARK2* and *PINK1* belong to a common pathway implicated in the maintenance of mitochondrial morphology and dynamics.²⁻⁷ In 2008, it was shown in mammalian cells that dissipation of $\Delta\Psi$ leads to recruitment of PARK2 to mitochondria, followed by their elimination by autophagy.⁸ Translocation of PARK2 to mitochondria depends on the accumulation of PINK1 on the outer mitochondrial membrane (OMM), and PD-causing

*Correspondence to: Olga Corti; Email: olga.corti@upmc.fr
Submitted: 09/16/2012; Revised: 07/17/2013; Accepted: 07/24/2013
<http://dx.doi.org/10.4161/auto.25884>

gene mutations compromise these events.⁹⁻¹³ Ubiquitination by PARK2 and proteasomal degradation of the OMM mitochondrial fission proteins MFN1/2 are early events triggered by $\Delta\Psi$ collapse;¹⁴ this study provided the first indication that the proteasome is also required for effective mitochondrial clearance. This machinery is critical for the PARK2-dependent proteolysis of a series of OMM proteins, a process associated with OMM rupture that precedes the degradation of dysfunctional organelles by autophagy.^{15,16}

Protein import into mitochondria relies on $\Delta\Psi$ and depends on the translocase of the OMM (TOMM), a multiprotein complex responsible for importing the majority of mitochondrial proteins, which are encoded by the nuclear genome.¹⁷ PINK1 is imported into mitochondria and following $\Delta\Psi$ loss, it forms a high molecular weight complex with the TOMM machinery.¹⁸ Here we investigate the role of the TOMM complex in the recruitment of PARK2 and explore its implication in the different phases of the mitochondrial elimination program controlled by the PINK1-PARK2 pathway.

Results

Mitochondrial import blockade recruits PARK2 to the OMM

We investigated whether the recruitment of PARK2 to the OMM following $\Delta\Psi$ collapse was due to the disruption of mitochondrial import. We addressed this issue in three models of mitochondrial import impairment (Fig. 1; Fig. S1): COS7 cells treated with the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), widely used to study PINK1-PARK2-mediated mitochondrial clearance; HeLa cells modified for stable, doxycycline (Dox)-inducible depletion of the mitochondrial matrix LONP1 protease (HeLa-T-REx-sh*LONP1*), a multifunctional enzyme essential for mitochondrial biogenesis;^{19,20} and HEK293T cells transfected with modest amounts of an siRNA targeting the channel-forming *TOMM40* subunit of the TOMM machinery. Mitochondrial protein import efficiency was investigated by studying the cleavage of the N-terminal mitochondrial targeting signal (MTS) of a modified GFP protein (mitoGFP) by PMPC [peptidase (mitochondrial processing)], a process which is coupled to the import of preproteins (Fig. 1A).²¹⁻²³ Abundance of the cleaved, intramitochondrial form of mitoGFP was significantly lower in cells treated with CCCP or depleted of LONP1 than in control cells, demonstrating the impairment of mitochondrial protein import. As the effect was less clear in cells with lower TOMM40 levels, due to the moderate downregulation of its expression, we studied the abundance of mitoGFP in mitochondrion-enriched fractions treated with trypsin to eliminate exposed OMM proteins, including nonimported mitochondrial precursors (Fig. 1A). Under these conditions, we observed a decrease in mitoGFP levels proportional to the concentration of *TOMM40* siRNA, confirming the import defect.

We then studied the distribution of endogenous PARK2 in HEK293T cells and exogenous PARK2 in COS7 cells, in which the endogenous protein is undetectable with the

available antibodies, and in HeLa cells, which lack it. PARK2 was recruited to mitochondria clustered around the nucleus in all three models (Fig. 1A and B). As expected, CCCP treatment led to $\Delta\Psi$ loss, indicated by a strong decrease in the intensity of staining with the potentiometric mitochondrial dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) (Fig. 1C). Mitochondria were also moderately depolarized in cells lacking LONP1 (Dox⁺) or containing low levels of TOMM40.

PARK2 is recruited by PINK1 to the TOMM machinery

We hypothesized that PARK2 would be recruited to the OMM close to the TOMM machinery when mitochondrial import is impaired. The TOMM complex has a highly stable functional core unit consisting of the channel protein TOMM40 and the central receptor TOMM22, which holds the translocating preproteins and is essential for cell viability.^{17,24-26} Several small subunits and two loosely bound receptors for mitochondrial preproteins (TOMM20 and TOMM70A) are associated with the central core. To investigate the interaction between PARK2 and TOMM machinery subunits, we used Förster resonance energy transfer (FRET) microscopy. This technique, due to its great sensitivity, is particularly well suited to the detection of proximity between two proteins compatible with their interaction in cellulo.²⁷ We chose a FRET approach based on the detection of quenched donor fluorescence after photobleaching of the acceptor, with endogenous donor-acceptor protein pairs labeled with secondary antibodies conjugated to appropriate fluorophores (Fig. 2). FRET between pairs occurs only if the two fluorophores are separated by distances compatible with single protein molecules (≤ 10 nm).²⁷ In HEK293T cells treated with CCCP or with *TOMM40* siRNA, FRET was detected between endogenous PARK2 and TOMM70A, and to a lesser extent between PARK2 and TOMM40 (Fig. 2A and B); surprisingly, FRET was not detected between PARK2 and VDAC1, previously reported to be ubiquitinated by PARK2 after CCCP treatment.¹¹ These interactions were also observed with exogenous PARK2 in COS7 cells treated with CCCP and in HeLa-T-REx-sh*LONP1* cells depleted of LONP1, and for the TOMM70A-PARK2 pair, in control cells (Fig. S2A and S2B). FRET was never observed in cells immunostained with secondary antibodies only (Fig. S2C). To confirm these observations with a biochemical approach, we used the GST pulldown technique to test the interaction of PARK2 with subunits of the TOMM machinery in COS7 cells and HEK293T cells (not shown). TOMM70A bound specifically to GST-PARK2 but not to a GST control protein incubated with lysates from the two cell types (Fig. S2D). However, we did not detect a direct interaction between GST-PARK2 and TOMM40 or VDAC1.

We then investigated whether PINK1 is required for the recruitment of PARK2 to the TOMM machinery. In HEK293T cells treated with *TOMM40* siRNA or CCCP, FRET was detected between endogenous PINK1 and each of the four TOMM subunits examined, and between endogenous PINK1 and PARK2 (Fig. 2A and B). In cells silenced for *PINK1* or *PARK2*, no molecular interactions involving PARK2 were detected at the TOMM machinery (Fig. 2B). We then confirmed the above-described protein-protein interactions in

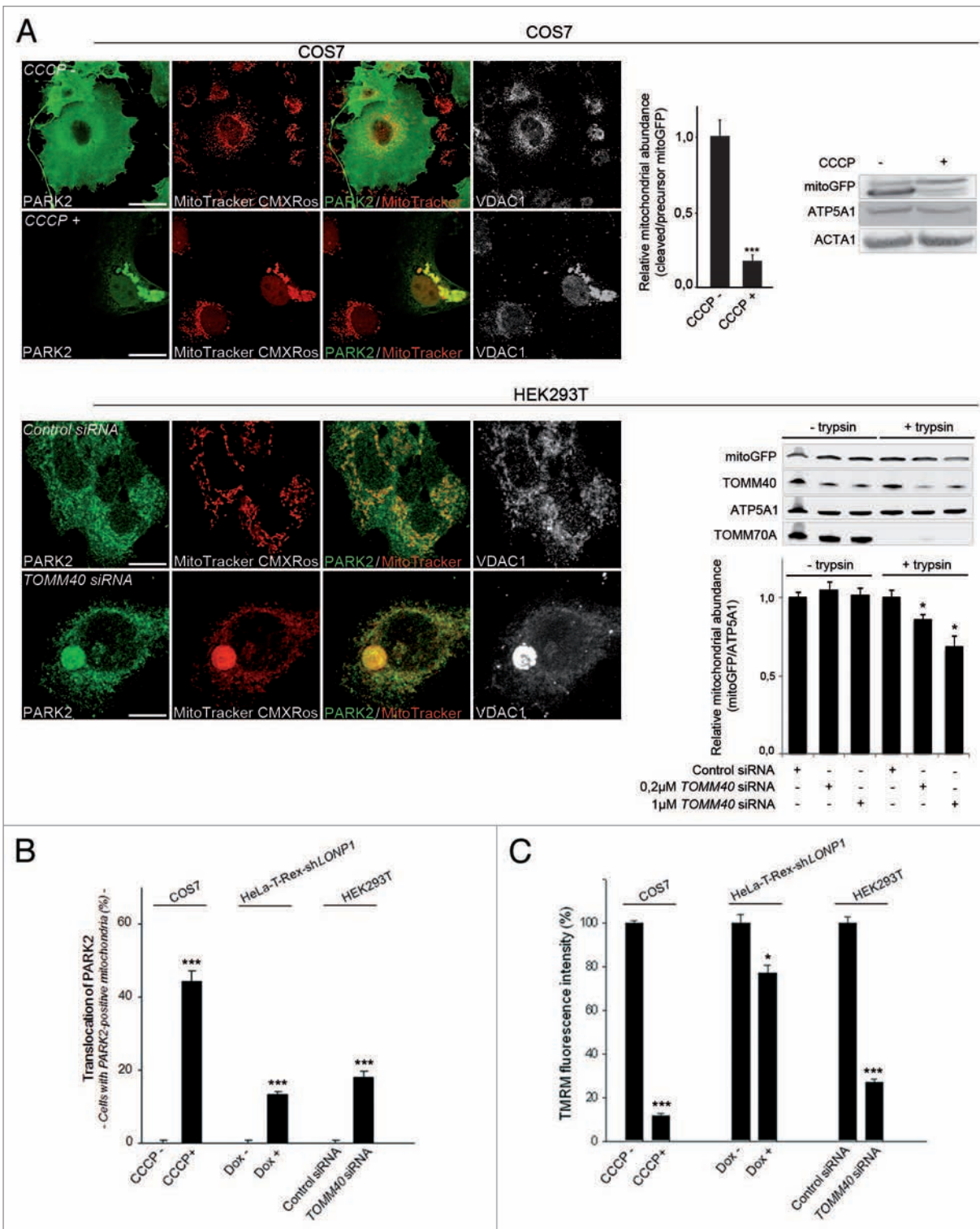


Figure 1. Impaired mitochondrial import triggers PARK2 recruitment to mitochondria. **(A)** Left panels: mitochondrial redistribution of PARK2 in models of defective mitochondrial protein import. Mitochondria were visualized with MitoTracker CMXRos and anti-VDAC1 staining. Treatments are indicated in italics. Right panels: mitochondrial import impairment of mitoGFP (western blots) and quantification of the abundance of the imported mitoGFP protein in total lysates from CCCP treated cells, or in mitochondrion-enriched fractions subjected to trypsin digestion in cells with lower TOMM40 levels ($n = 3$ independent experiments). Loading controls: ATP synthase subunit α (ATP5A1), ACTA1/actin (actin, $\alpha 1$, skeletal muscle). Note the disappearance of the TOMM70A immunoreactive band in trypsin-digested mitochondrial fractions. **(B)** Proportion of cells with colocalization of PARK2 and VDAC1 immunostainings in the various models. **(C)** Fluorescence intensity of TMRM in live cells. $n = 3$ independent wells from one of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. the corresponding control condition. Scale bar: 10 μm .

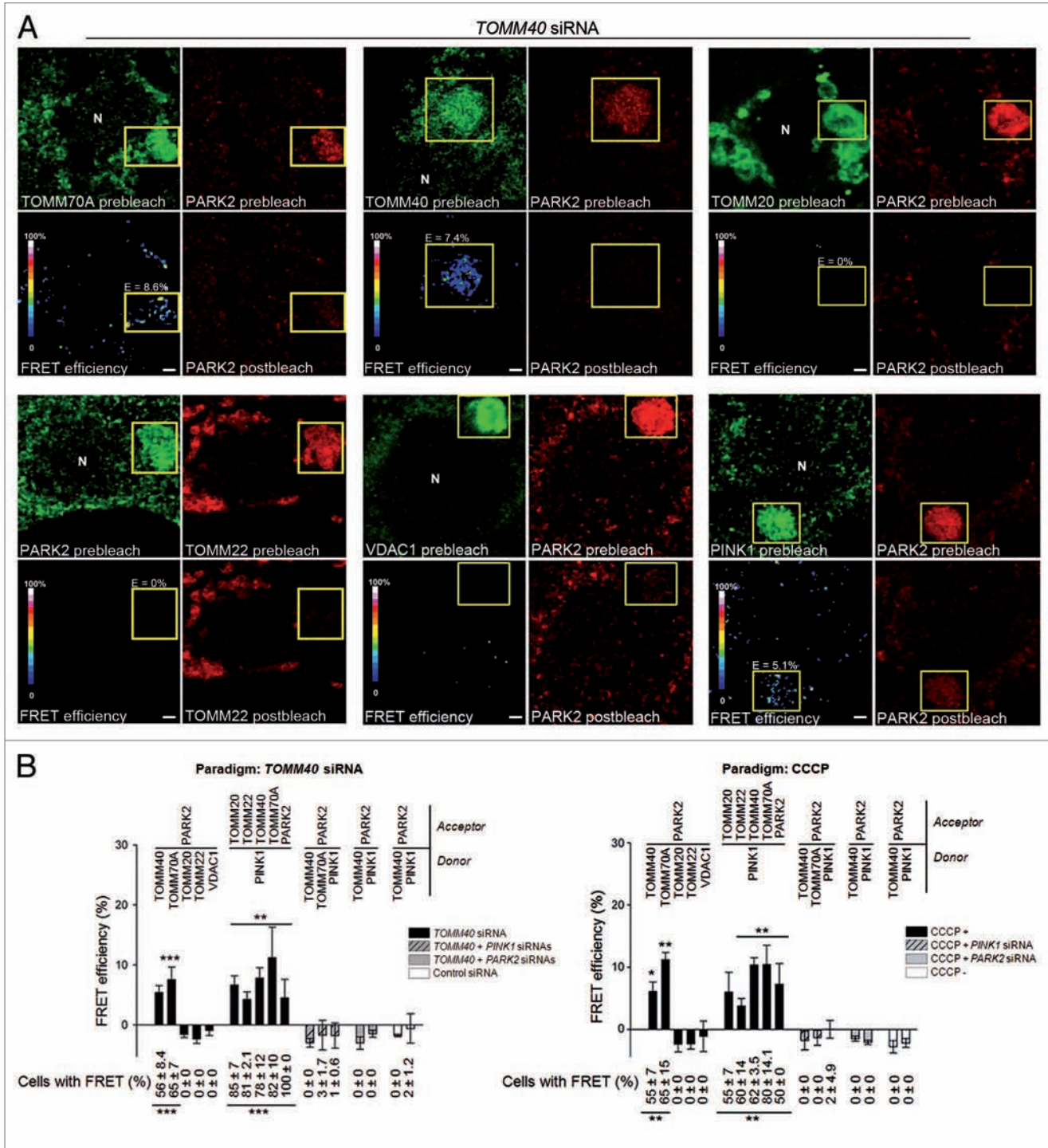


Figure 2. PARK2 interacts with the TOMM machinery in a PINK1-dependent manner. (A) Representative FRET images for the indicated donor (green)-acceptor (red) pairs in HEK293T cells with low TOMM40 levels. Pseudocolor scale: FRET efficiencies reflecting individual pixel donor fluorescence changes after acceptor photobleaching. E: mean FRET efficiency within the region of interest (ROI, yellow frame). N: nucleus. (B) Quantitative FRET analysis and percentage of cells with FRET for all donor-acceptor pairs analyzed in HEK293T cells transfected with siRNA against *TOMM40* or treated with CCCP. n = 10 to 35 cells from two independent experiments. Comparisons were made with VDAC1-PARK2 for donor-PARK2 pairs, PINK1-PARK2 in the corresponding "Control siRNA" or "CCCP-" conditions for PINK1-acceptor pairs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bar: 3 μ m.

mitochondrion-enriched fractions isolated from HEK293T cells. As expected, CCCP treatment resulted in stabilization of the long form of PINK1 at the mitochondrion and recruitment of PARK2 (Fig. S3A). Furthermore, we detected FRET between PARK2 and all components of the TOMM machinery tested and between PARK2 and PINK1, but not VDAC1 (Fig. S3B). Again, the TOMM70A-PARK2 interaction appeared to be the strongest, as it was also detected in mitochondria from untreated cells.

PD-causing mutations disrupt the interaction between PARK2 and the TOMM complex

To evaluate the relevance of the identified interactions, we then explored the effects of PD-causing missense *PARK2* mutations on PARK2 recruitment to the TOMM machinery. FRET efficiencies between TOMM70A and each of nine *PARK2* variants overproduced in COS7 cells were lower than those between TOMM70A and normal *PARK2* after CCCP treatment. Furthermore, all the mutations tested abolished energy transfer from TOMM40 to PARK2 (Fig. 3A and B), suggesting that they alter the orientation of PARK2 within the complex, thereby modifying its behavior in FRET experiments.²⁷ We confirmed these findings by using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) as an alternative technique to analyze the impact of selected *PARK2* mutations with modest (K161N) or large (K211N, R256C) effects on the interaction of the protein with TOMM70A (Fig. 3B).²⁷ This approach is based on the shortening of the fluorescence lifetime of a donor in close proximity of a fluorescence acceptor, due to the FRET effect. Consistent with FRET measurements, the presence of fluorescently labeled PARK2 or its K161N variant, but not the K211N and R256C variants, significantly decreased the mean lifetime of TOMM70A fluorescence; normal *PARK2* had a stronger effect than the K161N variant.

Depletion of subunits of the TOMM core complex primes mitochondria for OMM clearance

TOMM machinery subunits are among the first proteins to be degraded in a PARK2-dependent manner during OMM proteolysis and rupture.^{15,16} On the basis of the preceding observations, we hypothesized that the degradation of TOMM subunits might be a key event in mitochondrial degradation promoted by PINK1 and PARK2. We therefore analyzed the consequences of moderate depletion of specific TOMM subunits on the clearance of mitochondrial markers in COS7 cells treated with CCCP (Fig. 4). As expected, PARK2 promoted degradation of the dysfunctional mitochondrial network, as illustrated by the disappearance of OMM (VDAC1) and mitochondrial matrix markers (PMPCB) in cells in which it was overproduced (Fig. 4A and B).⁸ The depletion of TOMM subunits did not further enhance the mitochondrial loss triggered by PARK2 (Fig. 4B). However, the partial silencing of *TOMM22* or *TOMM40* alone, but not of *TOMM20* or *TOMM70A*, mimicked the effect of PARK2 on VDAC1 and the intermembrane space protein CYCS/cytochrome *c*, leading to their loss (Fig. 4A and B; Fig. S4A). Decreases in *TOMM22* or *TOMM40* levels did not result in the loss of PMPCB in the absence of exogenous PARK2, although staining for this marker was systematically

fragmented and fainter than in control cells, indicating that PARK2 is indispensable for complete mitochondrial degradation (Fig. 4A and B; Fig. S4B).

To control for the specificity of the observed effects, we designed “rescue” experiments by overexpressing cDNAs resistant to siRNA. As expected, reintroduction of TOMM40 or TOMM22 in the corresponding paradigms of downregulation significantly reduced the loss of VDAC1 triggered by CCCP (Fig. 4C; Fig. S4C). Importantly, overproduction of TOMM40 or TOMM22, but not TOMM70A, significantly reduced the loss of VDAC1 and PMPCB triggered by PARK2 following CCCP treatment. Altogether, these findings indicate that degradation of the core structure of the TOMM machinery is a crucial step in the mitochondrial clearance program, downstream of mitochondrial recruitment of PARK2 by PINK1.

PARK2, but not PINK1, is indispensable for the degradation of whole mitochondria

We then asked whether PINK1 plays a role beyond recruitment of PARK2 to mitochondria and the degradation of subunits of the TOMM machinery in mitochondrial clearance. We, therefore, investigated whether the requirement for PINK1 in mitochondrial degradation could be bypassed by silencing *TOMM40* (Fig. 5). The concomitant downregulation of *TOMM40* and *PINK1* did not prevent OMM clearance, as demonstrated by the loss of VDAC1 and CYCS staining in similar proportions of cells in the presence and absence of PINK1 (Fig. 5A and B; Fig. S5A). Of note, PINK1 was also dispensable for the degradation of whole organelles, which, in this model, was only accomplished in the presence of exogenous PARK2, as illustrated by clearance of the matrix marker PMPCB. As expected, PINK1 was indispensable for mitochondrial clearance induced by PARK2 in cells not treated with *TOMM40* siRNA exposed to CCCP (Fig. 5A and B).⁹⁻¹³

As previously mentioned, complete disappearance of PMPCB staining was never observed in cells with lower TOMM40 levels in the absence of exogenous PARK2. However, the staining was always less widespread than in control cells after CCCP treatment, possibly reflecting mitochondrial clearance promoted by endogenous PARK2. Therefore, we measured the area occupied by mitochondrial staining in cells in different conditions (Fig. 5C and D). This is a more quantitative method for estimating mitochondrial loss than the simple scoring of cells with or without labeling, a method commonly used by researchers in the field.^{8-10,14,15,18,28-31} With this method, CCCP treatment decreased PMPCB staining in cells overproducing PARK2 by nearly 80%, validating the approach and demonstrating that it is more sensitive than cell scoring. This decrease was completely reversed when *PINK1* was downregulated. Remarkably, depletion of TOMM40 resulted in a nearly 50% decrease in the area covered by PMPCB staining after CCCP treatment in the absence of exogenous PARK2. As expected from our above-mentioned results, the absence of PINK1 did not prevent loss of PMPCB staining under these conditions. In addition, we observed a nearly 20% reduction in PMPCB staining in the absence of CCCP in cells depleted of TOMM40, which was again unaffected by the downregulation of *PINK1*, but completely reversed by knockdown of endogenous

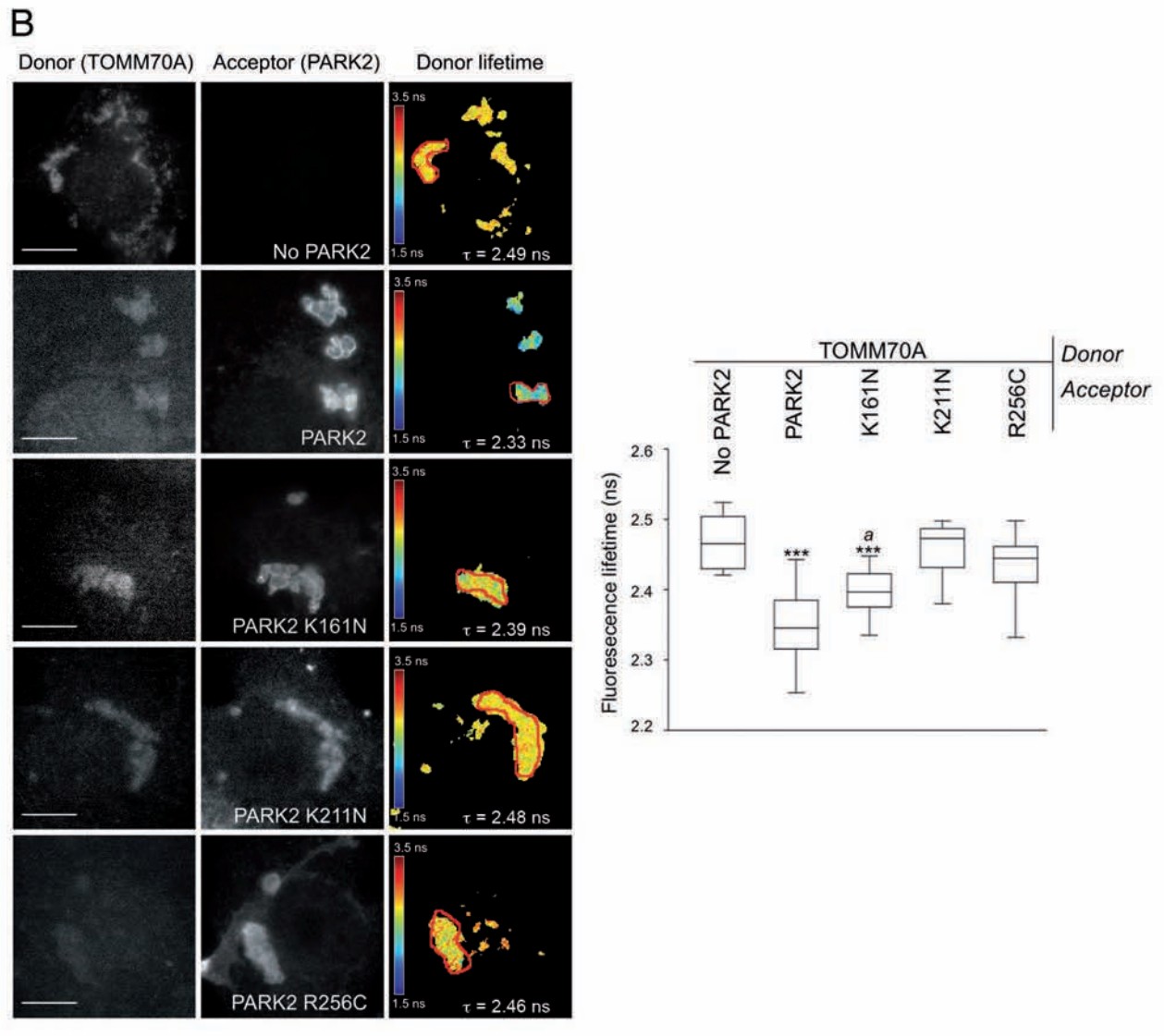
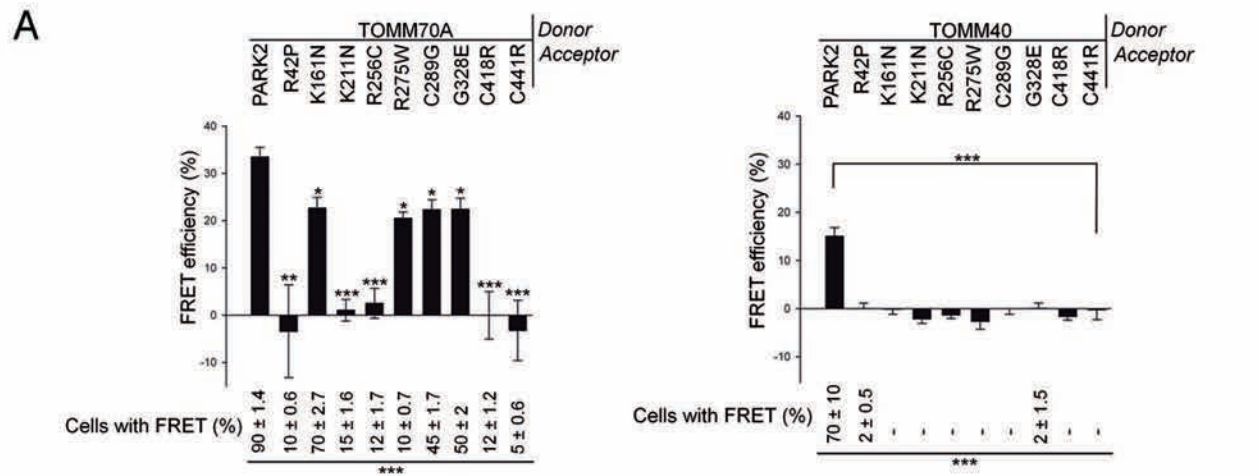


Figure 3. For figure legend, see page 7.

Figure 3 (See opposite page). PD-causing *PARK2* mutations disrupt the molecular interaction between *PARK2* and the TOMM machinery. **(A)** FRET efficiencies and percentages of cells displaying FRET for the indicated donor (endogenous TOMM subunits)-acceptor (exogenous *PARK2* variants) pairs in COS7 cells treated with CCCP. $n = 10$ to 20 cells from one experiment representative of two (TOMM40) or three (TOMM70A). **(B)** FLIM analysis of TOMM70A (donor) in the presence of *PARK2* (acceptor) variants in COS7 cells treated with CCCP. Pseudocolor scale, τ : individual and mean lifetimes within the ROI (red frame). No *PARK2*: immunostaining procedure excluded fluorophore-conjugated secondary antibody for *PARK2*. $n = 20$ ROIs per condition from three independent experiments. Comparisons were made with normal *PARK2* in **(A)** or with TOMM70A-No *PARK2* (*) or TOMM70A-*PARK2* (°) in **(B)**. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bar: 10 μm .

PARK2 (Fig. 5E). Altogether, these findings support the idea that the degradation of TOMM subunits is an event intrinsic to the PINK1-*PARK2* pathway, situated temporally downstream of the PINK1-dependent recruitment of *PARK2* to the OMM and upstream of the *PARK2*-dependent degradation of whole organelles.

To confirm that TOMM is a primary target of PINK1 and *PARK2* in OMM clearance, and exclude nonspecific triggering of the process by depletion of any protein involved in maintenance of mitochondrial import, we investigated mitochondrial loss following downregulation of *PMPCB*, encoding the catalytic subunit of the mitochondrial matrix protease PMPC (Fig. 6; Fig. S5B). PMPC processes mitochondrial preproteins by cleaving their MTS; it is thought to be essential for mitochondrial import, including that of PINK1.^{22,23,32} Contrary to downregulation of *TOMM40* or *TOMM22*, moderate downregulation of *PMPCB* did not result in a massive loss of mitochondrial markers after CCCP treatment: no more than 15–20% of the cells lacked VDAC1 or the matrix enzyme HSD17B10 in the absence of exogenous *PARK2*. Moreover, loss of these markers was further limited by the simultaneous silencing of *PINK1* in cells with lower *PMPCB* levels, demonstrating complete dependence on the PINK1-*PARK2* pathway. Again, the downregulation of *TOMM40* was sufficient to trigger *PARK2*-dependent elimination of mitochondrial markers in the absence of PINK1 in this model (Fig. 6, graph). In addition, the effects of *PMPCB* silencing, *TOMM40* downregulation and *PARK2* overproduction were not additive, demonstrating that mitochondrial degradation in this context occurs within the PINK1-*PARK2* pathway.

Downregulation of *TOMM40* triggers *PARK2*-dependent mitophagy

To formally demonstrate that the loss of mitochondrial markers observed following downregulation of *TOMM40* is indeed caused by autophagy, we quantified the relative proportion of LC3-positive vesicles associated with mitochondria in cells overproducing the fluorescent autophagosome marker LC3-dsRed (Fig. 7A). As expected, in cells treated with CCCP, overproduction of *PARK2* resulted in a nearly 100% increase in the number of LC3-positive vesicles covering mitochondria compared with control cells not treated with CCCP or not overproducing *PARK2*. In cells with low *TOMM40* levels, this increase was 200% in the presence of CCCP and already 50% in its absence, supporting the involvement of autophagy in the clearance of mitochondrial markers previously observed in these paradigms (Fig. 5B).

To strengthen these findings, we tested the involvement of specific degradation pathways by treating the cells with (1) the proteasomal inhibitor epoxomicin, (2) 3-methyladenine, to

block autophagosome formation, and (3) the lysosome inhibitor bafilomycin A₁ (Fig. S6). All three treatments prevented PINK1 and *PARK2*-dependent clearance of mitochondrial markers, demonstrating the cooperation among these pathways in this process already reported.^{8,14-16} In addition, these treatments prevented the loss of VDAC1 and CYCS in cells with low *TOMM40* levels.

We then explored the role of key components of the autophagy pathway, *ATG5*, *ATG7* and *AMBRA1*, by siRNA-mediated gene silencing (Fig. 7B). As previously shown, scoring the proportion of cells without mitochondrial markers demonstrated that the three proteins are essential for *PARK2*-mediated mitophagy, as illustrated by the loss of the matrix marker *PMPCB*.^{8,9,16,30} In contrast, the clearance of the OMM marker VDAC1 did not depend on these proteins in cells with exogenous *PARK2* or with low *TOMM40* levels after CCCP treatment, in agreement with the role of the proteasome in the digestion of OMM proteins (Fig. S6).^{15,16} To demonstrate that the reduction in *PMPCB* staining (Fig. 5C) is also due to mitophagy, we further evaluated the effect of the downregulation of *ATG5*, *ATG7*, and *AMBRA1* in cells with low *TOMM40* levels, by quantifying the relative area occupied by *PMPCB* staining in this model (Fig. 7C). Again, loss of this staining was prevented in all cases, demonstrating the involvement of autophagy; this provides further evidence that the mechanism underlying mitochondrial degradation triggered by downregulation of *TOMM40* is the same as those underlying *PARK2*-dependent mitophagy.

Discussion

We provide evidence that PINK1 and *PARK2* constitute a molecular quality control sensor-effector system, coupling mitochondrial import efficiency with the clearance of dysfunctional mitochondria (Fig. 8). We showed that *PARK2* translocates to the OMM in two models in which protein import is impaired, associated with a less dramatic mitochondrial depolarization than that caused by CCCP. These observations are consistent with the recent demonstration that depletion of *PMPCB* is sufficient to stabilize PINK1 and recruit *PARK2* to mitochondria in the absence of $\Delta\Psi$ loss, and suggest that impaired mitochondrial import through the TOMM machinery is the primary signal for PINK1 and *PARK2*-mediated mitochondrial elimination.³² In support of this hypothesis, Lazarou et al. have discovered, using biochemical approaches, that PINK1 interacts with TOMM20 in the TOMM machinery following CCCP treatment.¹⁸ *PARK2* was not identified in this complex, but, as the authors of the study stated, this does not exclude association; it rather reflects experimental conditions in which transient or labile interactions are not preserved. By

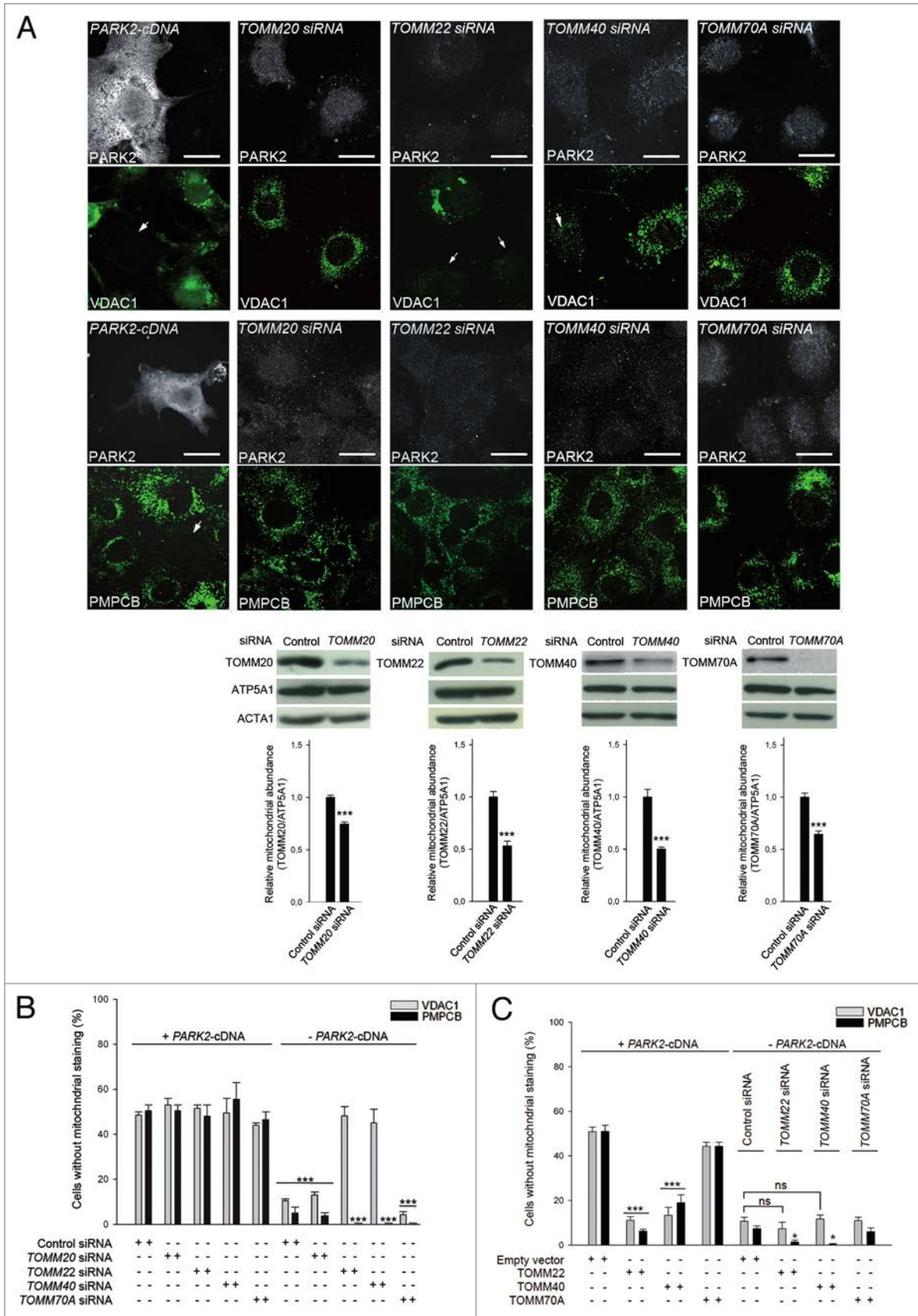


Figure 4. For figure legend, see page 9.

Figure 4 (See opposite page). Depletion of TOMM core complex subunits initiates the mitochondrial clearance program mediated by the PINK1-PARK2 pathway. **(A)** Fate of VDAC1 or PMPCB after CCCP treatment in COS7 cells overproducing PARK2 or with low levels of the indicated TOMM subunits. Arrows: loss of mitochondrial markers. Western blot analyses and corresponding quantifications: efficacy of downregulation for each TOMM subunit in total cell extracts. $n = 3$ independent wells from one representative experiment. ATP5A1, ACTA1: loading controls. **(B)** Quantification of the proportion of cells in which the indicated mitochondrial marker proteins were absent, in the experiment shown in **(A)** or **(C)** from COS7 cells with exogenous PARK2 or treated with the indicated siRNAs, after overproduction of the indicated TOMM subunits and CCCP treatment. $n = 3$ independent experiments. $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ vs. **(A)** "Control siRNA"; **(B)** the corresponding condition with exogenous PARK2; or **(C)** "Empty vector" within the "+ PARK2" or "- PARK2" condition. ns: not significant. Scale bar: 10 μm .

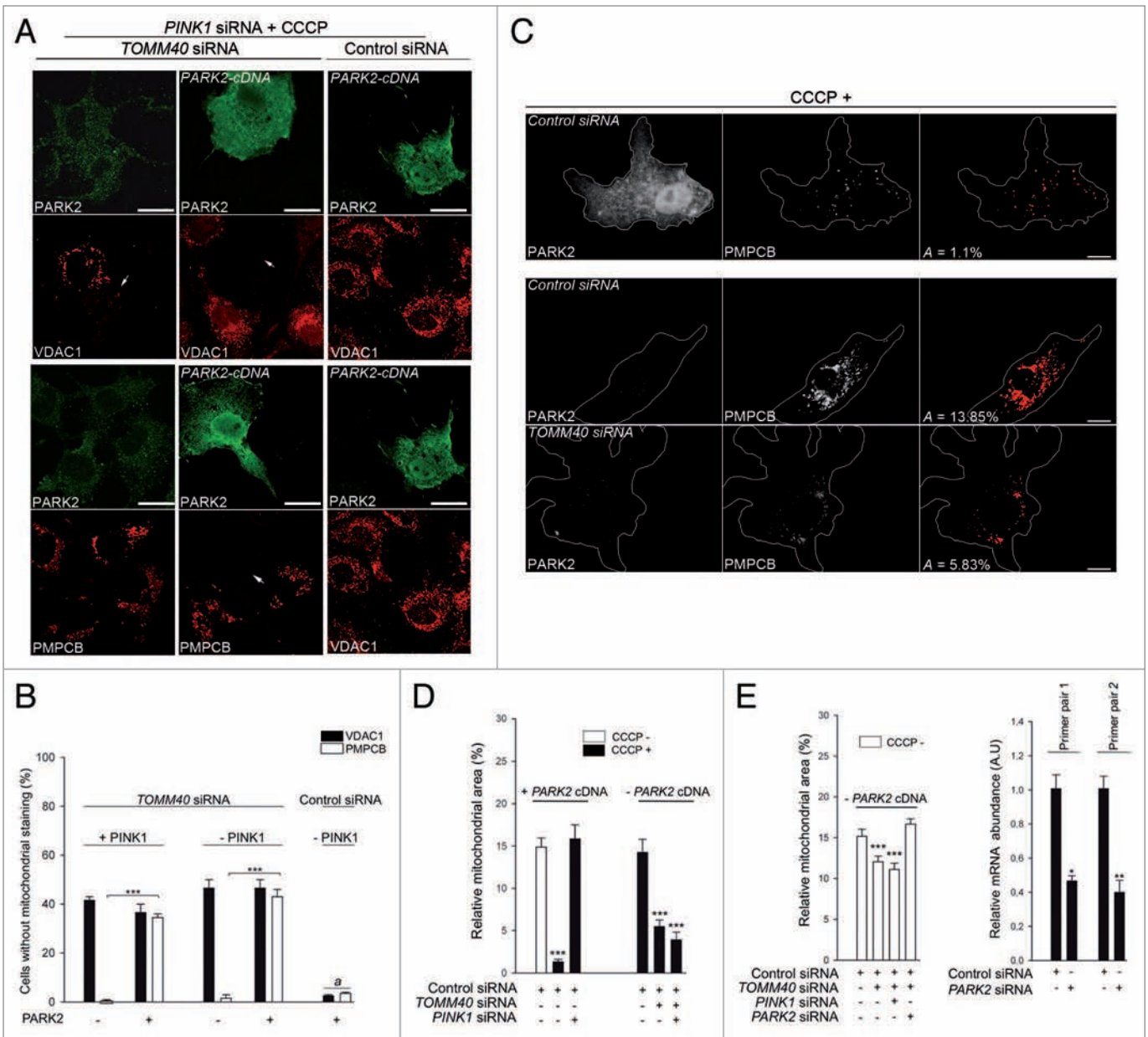


Figure 5. Depletion of TOMM core complex subunits bypasses the requirement for PINK1, but not PARK2, in mitochondrial clearance. **(A)** Immunostaining and **(B)** corresponding quantifications illustrating the effect of PINK1 depletion on the fate of VDAC1 and PMPCB in COS7 cells with low TOMM40 levels, with or without exogenous PARK2, or in cells with exogenous PARK2 only. Arrows: loss of mitochondrial markers. $n = 3$ independent wells from one experiment representative of five. **(C)** Images illustrating the relative loss of PMPCB immunostaining in representative conditions. The right panels show PMPCB staining after application of a threshold mask, with A corresponding to mitochondrial area relative to total cell area. **(D and E)**, left graph) Quantification of the cell area covered by PMPCB (relative mitochondrial area), estimated as in **(C)**, in the indicated conditions. $n = 3$ independent wells from one experiment representative of three. **(E)**, right graph) Effect of siRNA-mediated silencing of endogenous *PARK2*, estimated by real-time PCR with two different primer pairs on mRNA extracted from COS7 cells and retrotranscribed into cDNA. $n = 3$ independent wells from one representative experiment out of two. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. the corresponding control condition: "+ PARK2" in **(B)**, "Control siRNA" **(D and E)**. $^aP < 0.001$ vs. the corresponding "TOMM40 siRNA" condition in **(B)**. Scale bar: 10 μm .

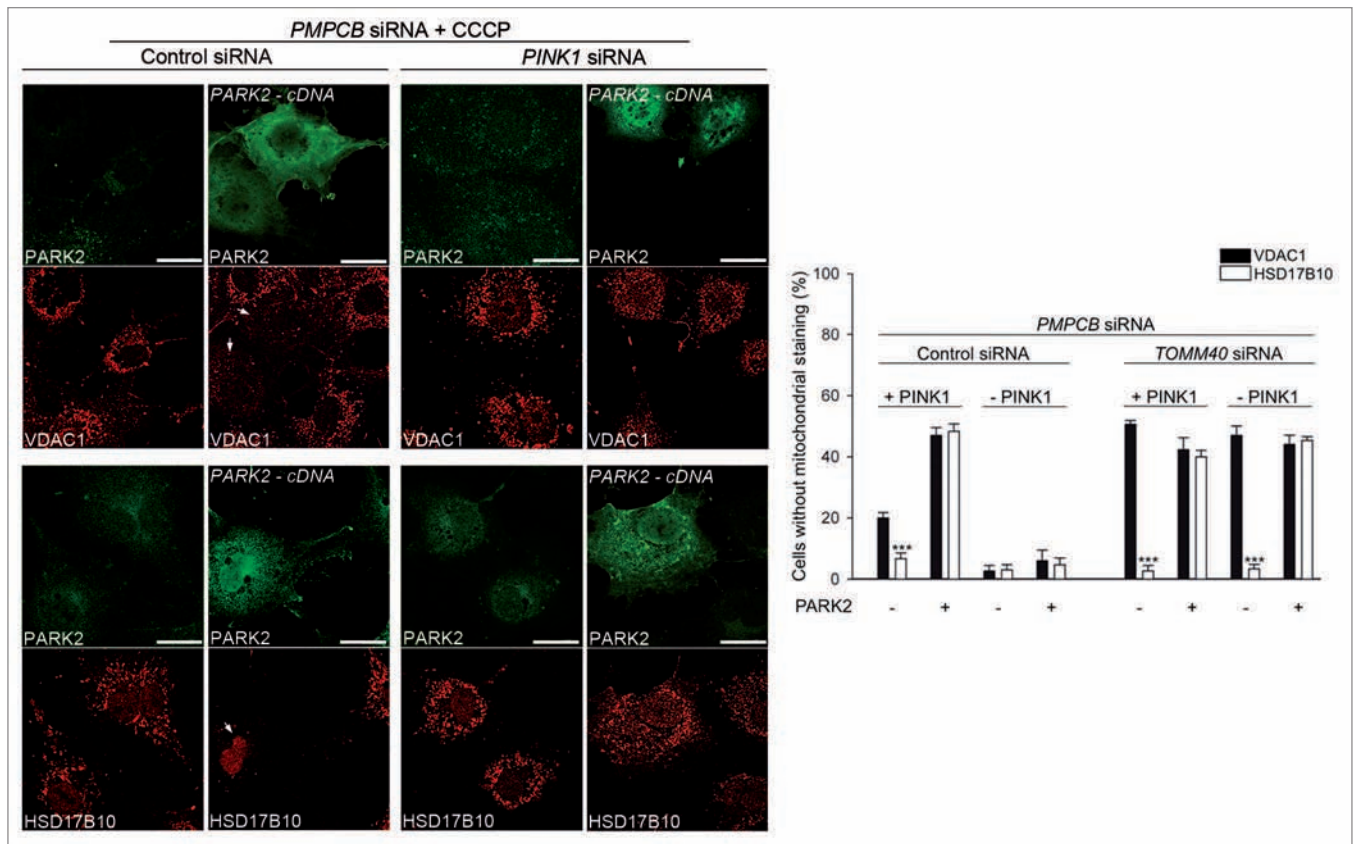


Figure 6. *PMPCB* downregulation does not prime mitochondria for OMM clearance. Effect of *PMPCB* downregulation on the clearance of VDAC1 and HSD17B10 (matrix marker) in COS7 cells with or without PINK1 or exogenous PARK2. n = 3 independent wells from one experiment representative of three. ****P* < 0.001 vs. the corresponding "+ PARK2 condition". Scale bar: 10 μ m.

using FRET-based microscopy, we confirmed here that PINK1 accumulates at the TOMM machinery when mitochondrial import is blocked. In addition, we demonstrated that PARK2 is brought into proximity to this complex, highlighting the power of FRET imaging techniques for detecting localized, endogenous protein-protein interactions.

TOMM70A may be the preferential target of PARK2 in the complex, since FRET levels were consistently higher for the TOMM70A-PARK2 pair than for the other pairs tested, and TOMM70A but no other TOMM subunit was retrieved by GST pulldown. Accordingly, two independent mass spectrometry studies have recently identified the TOMM70A receptor as one of the proteins binding to and ubiquitinated by PARK2 following CCCP treatment.^{34,35} Remarkably, the nine PD-causing missense *PARK2* mutations analyzed significantly reduced fluorescence energy transfer between TOMM70A and PARK2, indicating that this interaction is of physiopathological relevance. In addition, these mutations abolished FRET between TOMM40 and PARK2. This further supports the hypothesis that TOMM70A is the physical target of PARK2, and that weakening of this primary association modifies the relative configuration of the partners of the complex, precluding FRET from TOMM40 to PARK2. Indeed, although the presence of energy transfer in FRET experiments is unlikely to be an artifact, lack of FRET does not necessarily indicate an absence

of molecular proximity; it may also reflect nonpermissive orientations of the donor and acceptor.¹⁸ Such a situation may explain why we did not detect FRET between VDAC1 and PARK2, which based on previous studies should interact.^{11,31,34,35}

Our findings provide evidence that the TOMM machinery is a switch in the mitochondrial clearance program regulated by the PINK1-PARK2 pathway. They suggest that proteolytic destabilization of the TOMM core complex follows upon the recruitment of PARK2 and acts as the molecular trigger that initiates the degradation of proteins of the OMM and intermembrane space. The degradation of TOMM70A, which precedes that of other TOMM subunits according to previous studies,^{15,16} may permit the subsequent degradation of the core structure, with the intervention of PINK1 and PARK2. Consistent with this hypothesis, Sarraf et al., using anti-HA affinity purification-mass spectrometry to identify proteins associated with HA-tagged PARK2, have found TOMM70A after 1h of CCCP treatment and TOMM22 after 8h.³⁵ Future studies are required to define the specific mechanisms underlying the degradation of the different subunits of the TOMM complex and their spatiotemporal regulation.

Intriguingly, Lazarou et al. excluded that the TOMM complex is a key regulator of mitochondrial clearance.¹⁸ They showed that an exogenous PINK1 protein lacking the N-terminal MTS and targeted to the OMM by an artificial mitochondrial anchor was

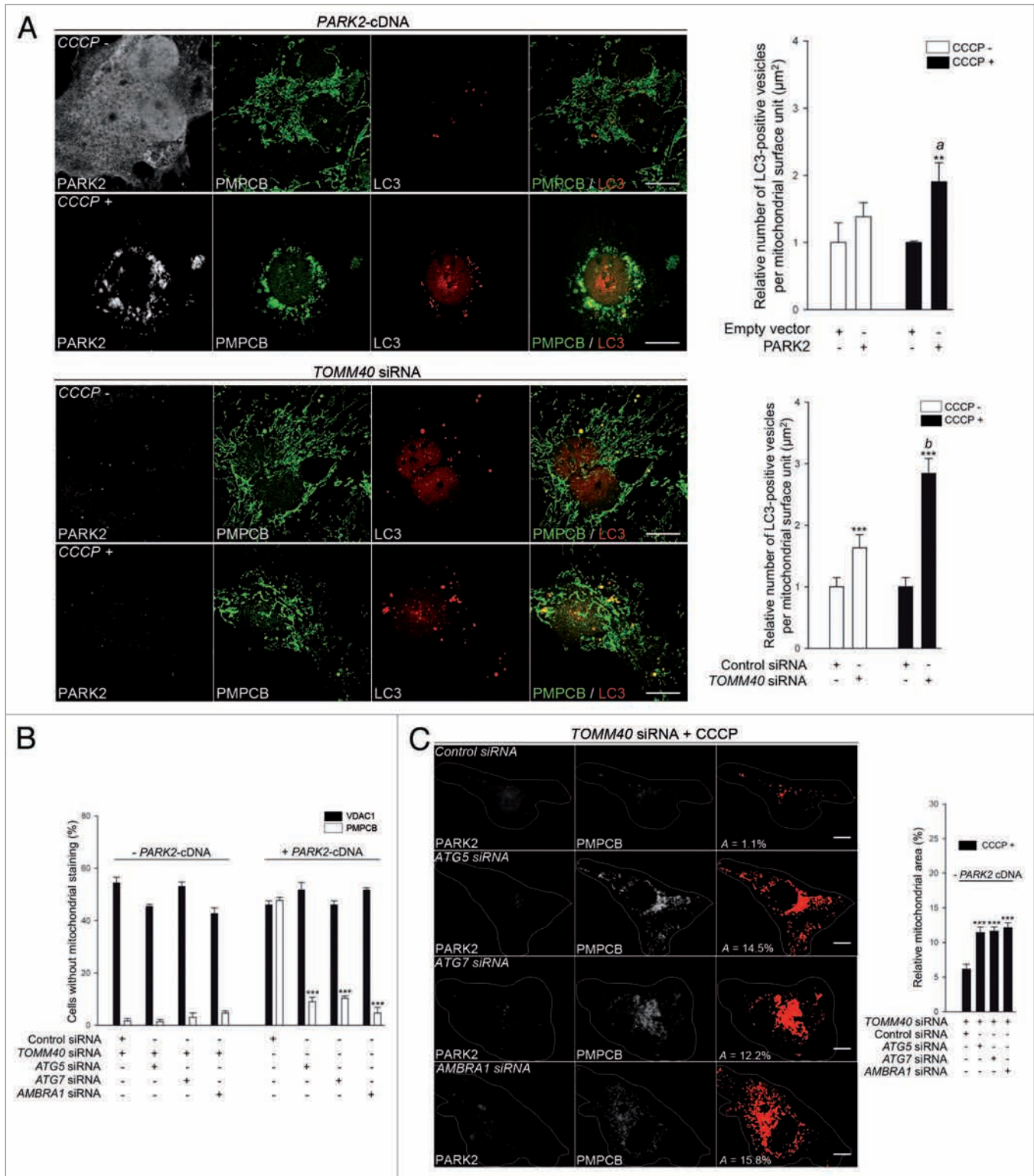


Figure 7. *TOMM40* downregulation triggers *PARK2*-dependent mitophagy. **(A)** Representative images illustrating LC3-positive vesicles associated with PMPCB staining in COS7 cells, in the indicated conditions. Right graphs: quantification of the number of LC3-positive vesicles contained for PMPCB relative to the total number of LC3 vesicles in cells, as explained in the Materials and Methods section. The control conditions were arbitrarily set at 1. $n = 20$ cells from three independent experiments. **(B)** Quantification of the proportion of cells without VDAC1 or PMPCB staining after overproduction of *PARK2* or downregulation of *TOMM40*, and silencing of *ATG5*, *ATG7*, or *AMBRA1*, as indicated. Cells were treated with CCCP in all conditions. $n = 3$ independent wells from one experiment representative of three. **(C)** Images showing the relative loss of PMPCB immunostaining and (graph) quantification of the relative mitochondrial area covered by PMPCB staining, estimated in the indicated conditions as explained in the legend of **Figure 5C**. A: relative mitochondrial area (%). $n = 30$ cells from one experiment representative of three. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. **(A)** the corresponding control condition within “CCCP +” or “CCCP -”; **(B and C)** the corresponding “Control siRNA” condition. $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$ vs. the corresponding “CCCP -” condition. Scale bar: 10 μm .

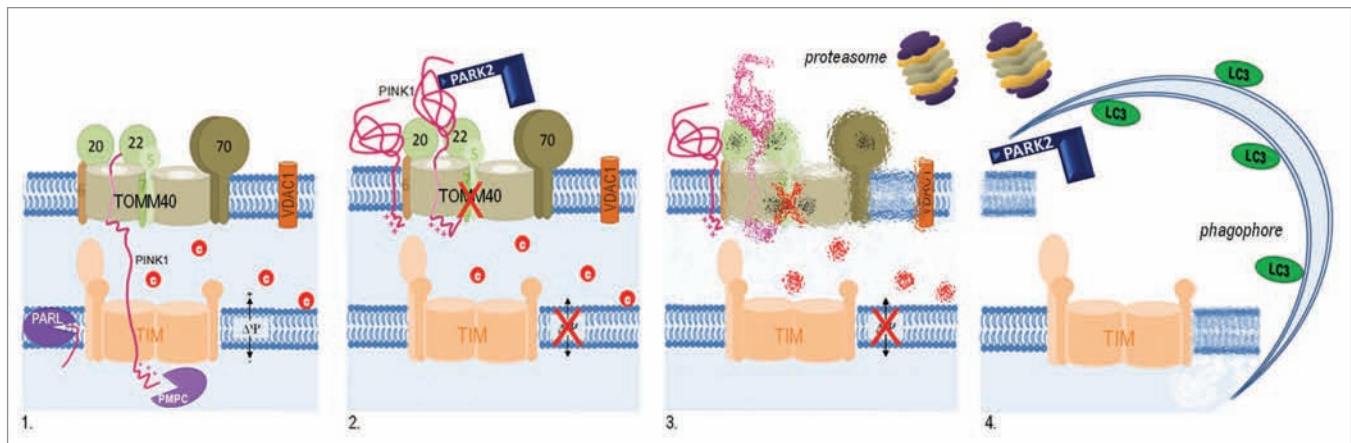


Figure 8. Model illustrating putative steps in the mitochondrial clearance program mediated by the PINK1-PARK2 pathway. PINK1 is imported into healthy mitochondria through the TOMM and TIMM complexes, and processed by PMPC and the presenilin-associated rhomboid-like protease PARL (1).³³ Loss of mitochondrial import efficiency, associated or not with $\Delta\Psi$ collapse, leads to accumulation of PINK1 at the OMM, recruitment of PARK2 in proximity of the TOMM complex (2), destabilization of the machinery, possibly caused by proteasomal degradation of key subunits, OMM rupture and proteolysis (3) and elimination of whole mitochondria by the proteasome and lysosome-dependent pathways (4). PINK1 and PARK2 are both required to trigger step 3, whereas only PARK2 is essential for step 4.

able to recruit PARK2 and initiate organelle degradation, despite the absence of stable associations with the TOMM complex. However, stable association might not be essential for PINK1 and PARK2 to degrade the machinery, and previous data do not rule out the possibility that ectopically targeted mitochondrial PINK1 is located close to the TOMM machinery. It remains to be determined how PINK1 targeted to peroxisomes can recruit PARK2 and activate pexophagy in the absence of a TOMM complex. However, since the roles of ubiquitin signaling in pexophagy and mitophagy are different, intrinsically distinct programs might be involved.^{29,36}

The investigation of the role of key elements of the autophagy machinery in our study confirmed that OMM proteolysis triggered by PINK1 and PARK2 relies on the ubiquitin-proteasome pathway; in addition, it demonstrated that PARK2 cooperates subsequently with ATG5, ATG7, and AMBRA1 in the absence of PINK1 to promote the degradation of mitochondrial remnants. As PINK1 is dispensable for this second phase, physical association of PARK2 with mitochondria may not be necessary at this stage, or PARK2 may bind other mitochondrial proteins. VDACs are excellent candidates, since they have been identified as major partners of PARK2 in cells treated with CCCP and may play a role in mitophagy.^{11,31,34,35} These channels are abundant OMM proteins and may thus still be available to interact with PARK2 once the initial phase of mitochondrial degradation is launched. The degradation of the entire OMM may indeed not be necessary for entry into the second phase, since mitochondria with a largely intact OMM are found inside autophagosomes in cells treated with CCCP.¹⁶ The requirement for both the proteasome and autophagy machinery for efficient mitochondrial clearance also supports the view that the two phases of the mitochondrial degradation program are closely interlinked; rupture of the OMM caused by the degradation of critical OMM components may act as a signal for massive recruitment of the ubiquitin-proteasome and

autophagy-dependent pathways. Permeabilization and rupture of the OMM are key events in mitochondrion-dependent apoptosis,^{37,38} but no apoptotic features are observed after the triggering of mitochondrial degradation by the PINK1-PARK2 pathway,¹⁶ consistent with the existence of reciprocal regulations between mitochondrial clearance and cell death programs.³⁹

In summary, our findings suggest that mitochondrial quality control by the PINK1-PARK2 pathway becomes essential when protein flux through the TOMM machinery is impaired. *TOMM40* influences the age at onset of Alzheimer disease and changes in protein import efficiency have been reported in neurodegenerative conditions in humans and animal models, including *pink1*-deficient mice.⁴⁰⁻⁴² The loss of functional coupling between mitochondrial import and the neuroprotective degradation of dysfunctional OMM components or mitochondria may therefore be a primary pathogenic mechanism in autosomal recessive PD caused by *PARK2* or *PINK1* mutations.

Materials and Methods

Mammalian expression vectors, siRNAs, cell culture, and transfection

The vectors used were: pcDNA3-HA encoding human *PARK2* or *PARK2* variants,⁴³ *TOMM70A* and siRNA-resistant *TOMM22*, and *TOMM40*; pCB6 encoding an HA-tagged GFP fused to the N-terminal MTS of COX8A (kindly provided by M Rojo), and pDsRed2-LC3 (kindly provided by G Kroemer). The *TOMM70A* cDNA was cloned by PCR from a human cDNA bank obtained from HeLa cells (F Lacroute) and inserted into pcDNA3-V5-His-TOPO TA (Invitrogen, K4800-01). siRNA-resistant cDNAs for human *TOMM22* and *TOMM40* were produced by Genosphere Biotechnologies (synthesis according to our indications) and cloned into the HindIII/BamHI sites of pcDNA3-HA (A Fournier). The siRNA-resistant cDNA for *TOMM40* was designed by targeting the corresponding

siRNA-binding site (validated siRNA, Qiagen, SI00301966) with the following sequence: 5'-acaattggt tagctaccgta-3', carrying four silent mutations in the original cDNA sequence starting at position +768 from the ATG codon. As the binding site of the siRNA for *TOMM22* (validated siRNA, Qiagen, SI00125650) was located in the 3' UTR, the corresponding coding sequence was by itself resistant. Other siRNAs used were: validated *TOMM20* (SI00301959), *TOMM70A* (SI00301973), *ATG5* (SI02655310), *ATG7* (SI02655373), and *AMBRA1* (SI00397306) siRNAs (Qiagen); *PARK2* (HSS107593) and *PINK1* (HSS127945) stealth siRNAs (Invitrogen); *PMPCB* siRNA (Dharmacon, L-004747-00-0005); AllStars negative control siRNA (Qiagen, 1027281). HeLa-*tet-on-shLONPI* cells were generated by annealing a 68-base oligonucleotide starting at position 476 of the *LONPI* coding sequence (5'-gatctcgtt cgtctcgccc agcctttca agagaaggc tgggcgagac gaacttttg gaaagctt-3') to its complementary sequence and inserting the resulting sequence into pENTR/H1/TO⁺ (Block-it, Invitrogen, K4920-00). HeLa T-Rex cells (Invitrogen R71407) were transfected, by the calcium phosphate method, with the siRNA construct and stable clones were selected in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, 41966-052) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, 10270-106), 5 µg/ml blasticidin (Invitrogen R210-01), and 200 µg/ml zeocin (Invitrogen, R250-01). Production of the LONPI protease was controlled by adding Dox to the culture medium (2 µg/ml, Sigma, D-9891). COS7 cells and HEK293T cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine (Invitrogen, 25030024), and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, 15140-122). Cells were plated, at 80% confluence, on glass coverslips (Thermo Scientific, CB00140RA1) in 24-well cell plates for immunocytochemistry, in 6-well plates for western blot analyses of total cell lysates, or on 15 cm petri dishes for subcellular fractionation. Transfections were performed by the calcium phosphate method (HeLa cells) or with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668019), according to the manufacturer's instructions. Moderate downregulation of TOMM subunits was achieved with the corresponding siRNAs (0.2 µM). Where indicated, the cells were incubated with dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, D5879), 100 nM bafilomycin A₁ (Sigma, B1793) for 6 h (LC3-positive vesicles) or 48 h (clearance of mitochondrial markers), 10 mM 3-MA (Sigma, M9281) and 50 nM epoxomicin (Sigma, E3652) for 48 h, or with 10 µM CCCP (Sigma, C2759) for 6 h (mitochondrial translocation of PARK2, FRET, and FLIM analyses, quantification of LC3-positive vesicles) or 48 h (clearance of mitochondrial markers).

Quantitative real-time RT-PCR

To demonstrate the efficiency of the siRNA-mediated silencing of endogenous *PARK2* in COS7 cells, total RNA was isolated from cells transfected with control or *PARK2* siRNA using the RNeasy plus Mini Kit (Qiagen, 74134). RNA from each sample (1 µg) was reverse-transcribed into cDNA. Real-time PCR was performed with the LightCycler[®] 480 System (Roche Applied Science) and LightCycler[®] 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Applied Science, 04707516001). Results were analyzed using LightCycler 480 sw 1.5 quantification Software

(Roche Applied Science). *RPL13* was used as the reference gene for normalization. Primers used for *PARK2* were as follows: forward 1, 5'-cgcaacaaat agtcggaac-3'; reverse 1, 5'-gagggtcgtg aacaaactg-3'; forward 2, 5'-gaccctcaac ttgctactc-3'; reverse 2, 5'-acgcttcttt acattcccg-3'.

Subcellular fractionation, trypsin digestion assay, GST pulldown, and western blot analyses

Total protein fractions were obtained from cells lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5 mM DTT supplemented with phosphatase inhibitors (0.2 mM Na₃VO₄, 4 mg/ml NaF, 5.4 mg/ml β-glycerophosphate) and protease inhibitors (Complete Cocktail, 11836145001, Roche), after centrifugation at 12,500 g for 20 min at 4 °C. Alternatively, cells were lysed in 20 mM HEPES (pH 7.0), 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, with phosphatase and protease inhibitors, and passed through a 22 G needle. Mitochondrion-enriched fractions were obtained by differential centrifugation, from cells homogenized with a Dounce homogenizer (80 manual strokes), as previously described,³² or with a mitochondrion isolation kit used according to the manufacturer's instructions (human, 130-094-532 and separation columns, 130-042-401, MACS, Miltenyi Biotech). Mitochondrion-enriched fractions obtained by differential centrifugation were digested with 1 µg of trypsin (Sigma, T1426) per mg of protein for 20 min at 37 °C, where indicated. GST pulldown was performed as previously described.⁴³ Protein concentrations were determined with the BCA (Pierce, 23225) or Bradford (Bio-Rad, 500-0006) protein assays. Samples were boiled in protein sample buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Protran, GE 10401196, Whatman) and analyzed by western blotting with selected primary and secondary antibodies (Table 1). Membranes were incubated with enhanced chemiluminescence substrate (Pierce, 34076) and chemiluminescence and fluorescence signals were revealed on a film (ECL, Amersham Hyperfilm, 28906837), or captured with a KODAK Image Station 4000 MM (Carestream Health), with the MF-ChemiBIS Gel (DNR Bio-Imaging Systems) or Odyssey Imaging (Li-COR) systems and quantified with ImageJ software (NIH).

Immunocytochemistry and confocal microscopy

Cells were fixed in 4% formaldehyde (FA, Sigma, 252549, 500 ml) and stained with standard procedures. Mitochondrion-enriched fractions obtained by differential centrifugation were fixed in 4% FA, washed in phosphate-buffered saline (PBS), incubated overnight in a suspension of primary antibodies in PBS supplemented with 2% normal goat serum (NGS-PBS; Gibco, 16210-072) and then with secondary antibodies diluted in NGS-PBS for 45 min. The mitochondrial pellet was obtained by centrifugation at 660 g for 5 min, rinsed in PBS, resuspended and mounted in ProLong Gold Antifade reagent (Molecular Probes, P36930). The antibodies used for staining are indicated in Table 2. Mitochondrial dyes were obtained from Invitrogen and used at a concentration of 10 nM (TMRM, T-668) and 500 nM (MitoTracker DeepRed, M22426/CMXRos, M7512) according to the manufacturer's instructions. TMRM intensities

Table 1. Antibodies used for western blotting

Primary antibodies				
Type	Company	Catalog #	Host	Dilution
PARK2, clone Park8	Millipore	MAB5512	mouse	1:2000
Respiratory chain complexes (Total OXPHOS)	Mitosciences	458099	mouse	1:1000
GFP	Abcam	Ab290	rabbit	1:4000
VDAC1	Abcam	Ab15895	rabbit	1:1000
TOMM70A	Abcam	Ab106193	mouse	1:5000
TOMM40 clone H7	Santa Cruz	Sc-365466	mouse	1:500
TOMM20	Santa Cruz	Sc-11415	rabbit	1:500
TOMM22	Abcam	Ab10436	mouse	1:500
LONP1 (G. Isaya, Mayo Clinic Foundation Rochester, MN)	-	-	rabbit	1:1000
ACTA1	Sigma	A2066	rabbit	1:2000
PMPCB	Proteintech	16064-1-AP	rabbit	1:4000
Secondary antibodies				
CY3-conjugated anti-mouse/rabbit	Sigma	C2181/C2306	sheep	1:1000
Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse/rabbit	Invitrogen	A11070/A11029	goat	1:1000
IRDye 800CW-conjugated anti-mouse/rabbit	Li-Cor	926-32211/926-32210	goat	1:10000
IRDye 680RD-conjugated anti-mouse/rabbit	Li-Cor	926-68071/926-68070	goat	1:10000
horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse/rabbit	Jackson ImmunoResearch	115-035-146/111-035-144	goat	1:50000

were quantified with ImageJ software, on images of at least 200 live cells per condition cells taken with an inverted Zeiss Axiovert 200 videomicroscope (Zeiss) and a 20× oil immersion objective. Mitochondrial translocation of PARK2 or the lack of specific mitochondrial markers were quantified with a Zeiss AxioPlan 2 microscope (Zeiss) driven by ExploraNova FluoUp Imaging software (4.2.2, Explora Nova) and a 100× oil immersion objective (N.A. 1.40), with 60 to 90 cells scored per well. The relative mitochondrial area was calculated with ImageJ software on images from at least 30 cells per experiment, acquired as above; it was expressed as the ratio between the area covered by the PMPCB stain, selected with an automatic threshold mask, and the total cell area. Colocalization images were taken with an Olympus FV-1000 confocal microscope (Olympus) driven by Olympus FV-1000 Software, or with a Leica SP5 confocal microscope (Leica) (63× oil immersion objective, N.A. 1.40) driven by Leica Imaging Software. For FRET analysis, a ROI was photobleached with a 543 nm helium/neon laser for 20 ms. Images of donor and acceptor fluorescence were acquired before and after photobleaching with a 60× (N.A. 1.35) oil immersion objective. Images of the donor after the photobleaching procedure were corrected with ImageJ software for the general decrease in fluorescence intensity due to the acquisition process and quantified as described.²⁷ To quantify the number of LC3 vesicles per mitochondrial surface

unit (μm^2), Z-stacks were acquired from 20 cells per condition and processed with ImageJ software. After applying median and background elimination filters, a manually determined threshold mask was created for PMPCB and LC3-specific fluorescent stains. The particles counted were then selected by pixel size (from 0.1 to infinity) and by circularity (from 0.00 to 1.00), before applying watershed segmentation. The relative number of vesicles per mitochondrial surface unit was calculated as the ratio of the number of PMPCB-positive LC3 vesicles relative to the total number of LC3 vesicles per cell in cells treated with bafilomycin A₁, normalized to the same ratio in untreated cells. FLIM measurements were performed in the frequency domain, by phase modulation on a custom-built system based on a commercial module (Lifa, Lambert Instruments) attached to a Nikon TE-2000 inverted microscope (Nikon) with a 100× (N.A. 1.49) TIRF oil immersion objective (CFI Apochromat), a Coolsnap HQ CCD camera (Photometrics), a 473 nm modulated laser diode (Omicron) and a TIRF module for wide-field laser illumination. Fluorescence emission was selected with a band-pass filter (500 to 550 nm). Cells were analyzed with Li-FLIM software (Lambert Instruments).

Statistical analyses

Two-way ANOVA and the Holm-Sidak method were used to analyze the effects of siRNAs and PARK2 overproduction on mitochondrial marker loss (Fig. 4B); the effect of donor

Table 2. Antibodies used for immunocytochemical staining

Primary antibodies				
Type	Company	Catalog #	Host	Dilution
PARK2, clone Park8	Millipore	MAB5512	mouse	1:1000
TOMM20	Abcam	Ab56783	mouse	1:1000
TOMM20	Santa Cruz	Sc-11415	rabbit	1:500
TOMM22	Abcam	Ab10436	mouse	1:5000
TOMM22	Atlas Antibodies	HPA003037	rabbit	1:1000
TOMM22	Santa Cruz	Sc-14894	goat	1:200
CYCS, clone 7H8.2C12	BD PharMingen	556432	mouse	1:1000
HSD17B10	Abcam	Ab10260	mouse	1:2000
PARK2	Millipore	MAB5112	rabbit	1:7000
TOMM70A	Sigma	HPA014589	rabbit	1:200
TOMM70A	Abcam	Ab106193	mouse	1:2000
TOMM40	Santa Cruz	Sc-11414	rabbit	1:100
TOMM40 clone D2	Santa Cruz	Sc-365467	mouse	1:200
TOMM40	Santa Cruz	Sc-11022	goat	1:100
PMPCB	Proteintech	16064-1-AP	rabbit	1:400
VDAC1	Abcam	Ab15895	rabbit	1:200
LONP1 (G. Isaya, Mayo Clinic Foundation Rochester, MN)	-	-	rabbit	1:3000
PINK1	Novus Biologicals	BC100-494	rabbit	1:2500
ATG5	Novus Biologicals	NB110-53818	rabbit	1:500
ATG7	Abcam	Ab53255	rabbit	1:500
AMBRA1	Novus Biologicals	FLJ20294	rabbit	1:250
Secondary antibodies				
Alexa Fluor 488 anti-mouse/rabbit	Invitrogen	A11070/A11029	goat	1:2000; 1:10000*
Alexa Fluor 568 anti-mouse/rabbit	Invitrogen	A11036/A11031	goat	1:10000*; 1:30000*
Alexa Fluor 633 anti-mouse/rabbit	Invitrogen	A21050/A21070	goat	1:500
CY3-conjugated anti-mouse/rabbit	Sigma	C2181/C2306	sheep	1:2000

*Dilution used for FRET and FLIM studies

and treatment on FRET efficiencies for given donor-PARK2 pairs (Fig. 2C; Fig. S2A) or the effects of CCCP and PARK2 overproduction or *TOMM40* downregulation on the relative number of LC3-positive vesicles (Fig. 7A). One-way ANOVA and the Holm-Sidak method were used to analyze the effects of: *TOMM40* siRNA in the trypsin digestion assay (Fig. 1A); donors or acceptors on FRET efficiencies for given donor-acceptor pairs (Fig. 2B; Figs. S2B and S3B); *PARK2* mutations on FRET efficiencies and FLIM values (Fig. 3A and B); pharmacological treatments on the loss of mitochondrial markers

after PARK2 overproduction or *TOMM40* downregulation (Fig. S6); the overproduction of siRNA-resistant TOMM subunits on clearance of mitochondrial markers within the “+ PARK2” or “- PARK2 conditions” (Fig. 4C); *ATG5*, *ATG7*, or *AMBRA1* gene silencing strategies on the clearance of mitochondrial markers and on relative mitochondrial surface after PARK2 overproduction or *TOMM40* downregulation (Fig. 5D and E; Fig. 7B and C). ANOVA on ranks and the Tukey test were used to compare the effects of *PINK1* downregulation on mitochondrial marker loss (Figs. 5A and 6; Fig. S5A). The

Mann-Whitney U test was used to compare TMRM intensities between conditions within each cell type (Fig. 1C). The Student *t*-test was used to analyze the effect of CCCP (Fig. 1A) or Dox treatment (Fig. S1A) on the relative mitochondrial abundance of mitoGFP; PARK2 recruitment to mitochondria in each cell type (Fig. 1B); the effect of CCCP treatment on FRET efficiencies for donor-acceptor pairs in cells stained with secondary antibodies (Fig. S2C); the effect of *PINK1* downregulation on loss of mitochondrial markers in cells with or without *TOMM40* siRNA (Fig. 5B); the efficacy of the siRNA-mediated downregulation of *PARK2* by quantitative real-time RT-PCR (Fig. 5C), or of genes encoding TOMM subunits by western blot (Fig. 4A). Parametric statistical tests were used unless the data were not normally distributed.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing financial interests.

References

1. Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 2011; 91:1161-218; PMID:22013209; <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00022.2010>
2. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; 441:1162-6; PMID:16672981; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04779>
3. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; 441:1157-61; PMID:16672980; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04788>
4. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B. 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* 2006; 103:10793-8; PMID:16818890; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602493103>
5. Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:14503-8; PMID:18799731; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0803998105>
6. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:1638-43; PMID:18230723; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709336105>
7. Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, Vogel H, Lu B. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:7070-5; PMID:18443288; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711845105>
8. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183:795-803; PMID:19029340; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200809125>

Acknowledgments

We thank M Rojo (Bordeaux, France) for helpful discussions; D Rousseau (Grenoble, France) for helpful advice on the confocal analysis of mitochondrion-enriched fractions; S Bolte and the Cellular Imaging and Flow Cytometry Facility (IFR 83, Paris, France) for helpful advice on acquisition and analysis of confocal images of LC3-positive vesicles; T Guilbert (Imaging Facility, U1016, Institute Cochin, Paris, France) for macro designing and valuable help in the analysis of LC3-positive vesicles. 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*, MEFOPA (funded by the EU 7th Framework Programme, Grant Agreement HEALTH-2009-241791), *Fondation ICM, "Investissements d'avenir" ANR-10-LAIHU-06*. GB was supported by a fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research and by *Fondation de France*.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:
www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/25884

9. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010; 189:211-21; PMID:20404107; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200910140>
10. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000298; PMID:20126261; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>
11. Geisler S, Holmström KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, Kahle PJ, Springer W. The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 2010; 6:871-8; PMID:20798600; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.7.13286>
12. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:378-83; PMID:19966284; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911187107>
13. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:9-14; PMID:21179058; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3028>
14. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, Youle RJ. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 2010; 191:1367-80; PMID:21173115; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201007013>
15. Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RL, Hess S, Chan DC. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 2011; 20:1726-37; PMID:21296869; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr048>
16. Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2011; 286:19630-40; PMID:21454557; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.209338>
17. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 2009; 138:628-44; PMID:19703392; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
18. Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* 2012; 22:320-33; PMID:22280891; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.014>
19. Ngo JK, Davies KJ. Importance of the lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining lon in aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1119:78-87; PMID:18056957; <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1404.015>
20. Van Dyck L, Pearce DA, Sherman F. PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994; 269:238-42; PMID:8276800
21. Gakh O, Cavadini P, Isaya G. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592:63-77; PMID:12191769; [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00265-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00265-3)
22. Luciano P, Geoffroy S, Brandt A, Hernandez JF, Géli V. Functional cooperation of the mitochondrial processing peptidase subunits. *J Mol Biol* 1997; 272:213-25; PMID:9299349; <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1997.1231>
23. Yaffe MP, Schatz G. Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:4819-23; PMID:6235522; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.15.4819>
24. van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, et al. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 1999; 401:485-9; PMID:10519552; <http://dx.doi.org/10.1038/46802>
25. Ahting U, Thun C, Hegerl R, Typke D, Nargang FE, Neupert W, Nussberger S. The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 1999; 147:959-68; PMID:10579717; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.147.5.959>

26. Künkele KP, Heins S, Dembowski M, Nargang FE, Benz R, Thieffry M, Walz J, Lill R, Nussberger S, Neupert W. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 1998; 93:1009-19; PMID:9635430; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81206-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81206-4)
27. Snapp EL, Hegde RS. Rational design and evaluation of FRET experiments to measure protein proximities in cells. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 17:Unit 17 9
28. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; 12:119-31; PMID:20098416; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2012>
29. Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 2010; 6:1090-106; PMID:20890124; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.8.13426>
30. Van Humbeek C, Cornelissen T, Hofkens H, Mandemakers W, Gevaert K, De Strooper B, Vandenbergh W. Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J Neurosci* 2011; 31:10249-61; PMID:21753002; <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1917-11.2011>
31. Sun Y, Vashisht AA, Tchiew J, Wohlschlegel JA, Dreier L. Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* 2012; 287:40652-60; PMID:23060438; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.419721>
32. Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon EA. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* 2012; 13:378-85; PMID:22354088; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.14>
33. Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 2010; 191:933-42; PMID:21115803; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201008084>
34. Okatsu K, Iemura S, Koyano F, Go E, Kimura M, Natsume T, Tanaka K, Matsuda N. Mitochondrial hexokinase HK1 is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428:197-202; PMID:23068103; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.041>
35. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, Harper JW. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 2013; 496:372-6; PMID:23503661; <http://dx.doi.org/10.1038/nature12043>
36. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:20567-74; PMID:19074260; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810611105>
37. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91:627-37; PMID:9393856; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80450-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80450-X)
38. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 2006; 13:1396-402; PMID:16710362; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401963>
39. Saita S, Shirane M, Nakayama KI. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nat Commun* 2013; 4:1410; PMID:23361001; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2400>
40. Ferencz B, Karlsson S, Kalpouzos G. Promising genetic biomarkers of preclinical Alzheimer's disease: the influence of APOE and TOMM40 on brain integrity. *Int J Alzheimers Dis* 2012; 2012:421452; PMID:22550605; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/421452>
41. Li Q, Vande Velde C, Israelson A, Xie J, Bailey AO, Dong MQ, Chun SJ, Roy T, Winer L, Yates JR, et al. ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:21146-51; PMID:21078990; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014862107>
42. Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, Voos W, Leuner K, Müller WE, Kudin AP, et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One* 2009; 4:e5777; PMID:19492057; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005777>
43. Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2059-75; PMID:16714300; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl131>



Supplemental Material to:

**Giulia Bertolin, Rosa Ferrando-Miguel, Maxime Jacoupy,
Sabine Traver, Karl Grenier, Andrew W Greene,
Aurélien Dauphin, François Waharte, Aurélien Bayot,
Jean Salamero, Anne Lombès, Anne-Laure Bulteau,
Edward A Fon, Alexis Brice, Olga Corti**

**The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1
and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance**

Autophagy 2013; 9(11)

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.25884>

www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/25884

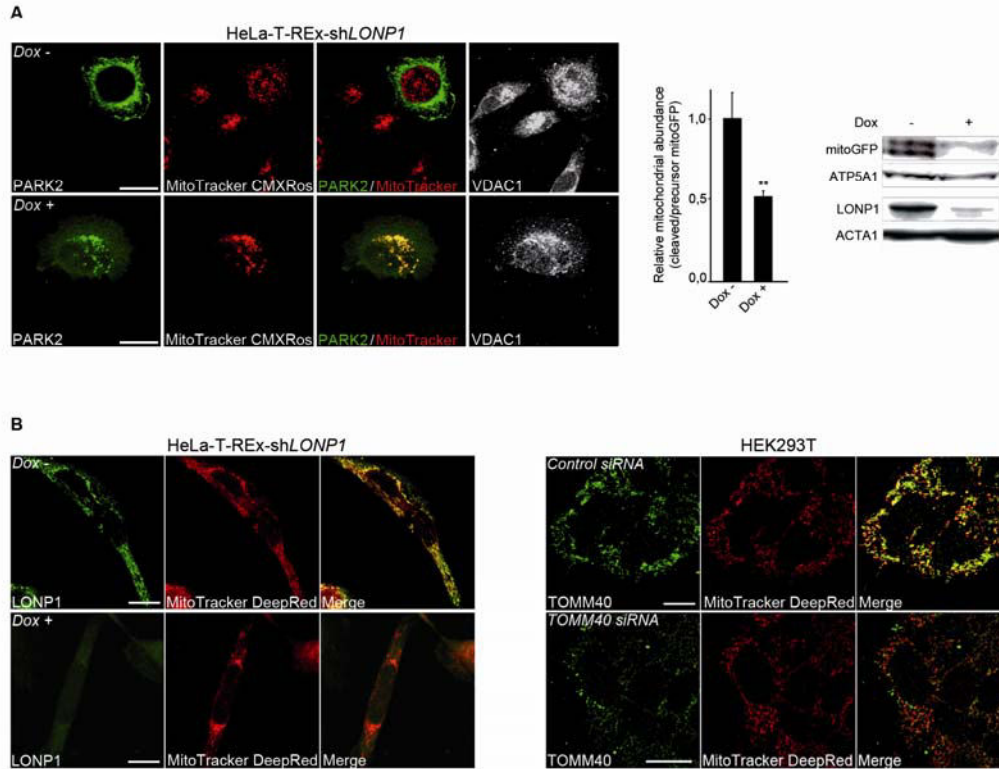


Figure S1. Mitochondrial import blockade recruits PARK2 to mitochondria. **(A)** Mitochondrial redistribution of PARK2 (left panels) in LONP1-depleted HeLa cells and quantification of the abundance of the imported mitoGFP protein in total cell lysates (western blot and graph). ($n = 3$ independent experiments). Mitochondria (left panels) were visualized with MitoTracker CMXRos and anti-VDAC1 staining. Loading controls in western blots: ATP5A1, ACTA1. **(B)** Representative immunofluorescent images illustrating the efficiency of the gene silencing strategy for *LONP1* in HeLa-T-Rex-shLONP1 cells treated with Dox, and for TOMM40 in HEK293T cells. Mitochondria were labeled with MitoTracker DeepRed. Scale bar, 10 μm . ** $p < 0.01$.

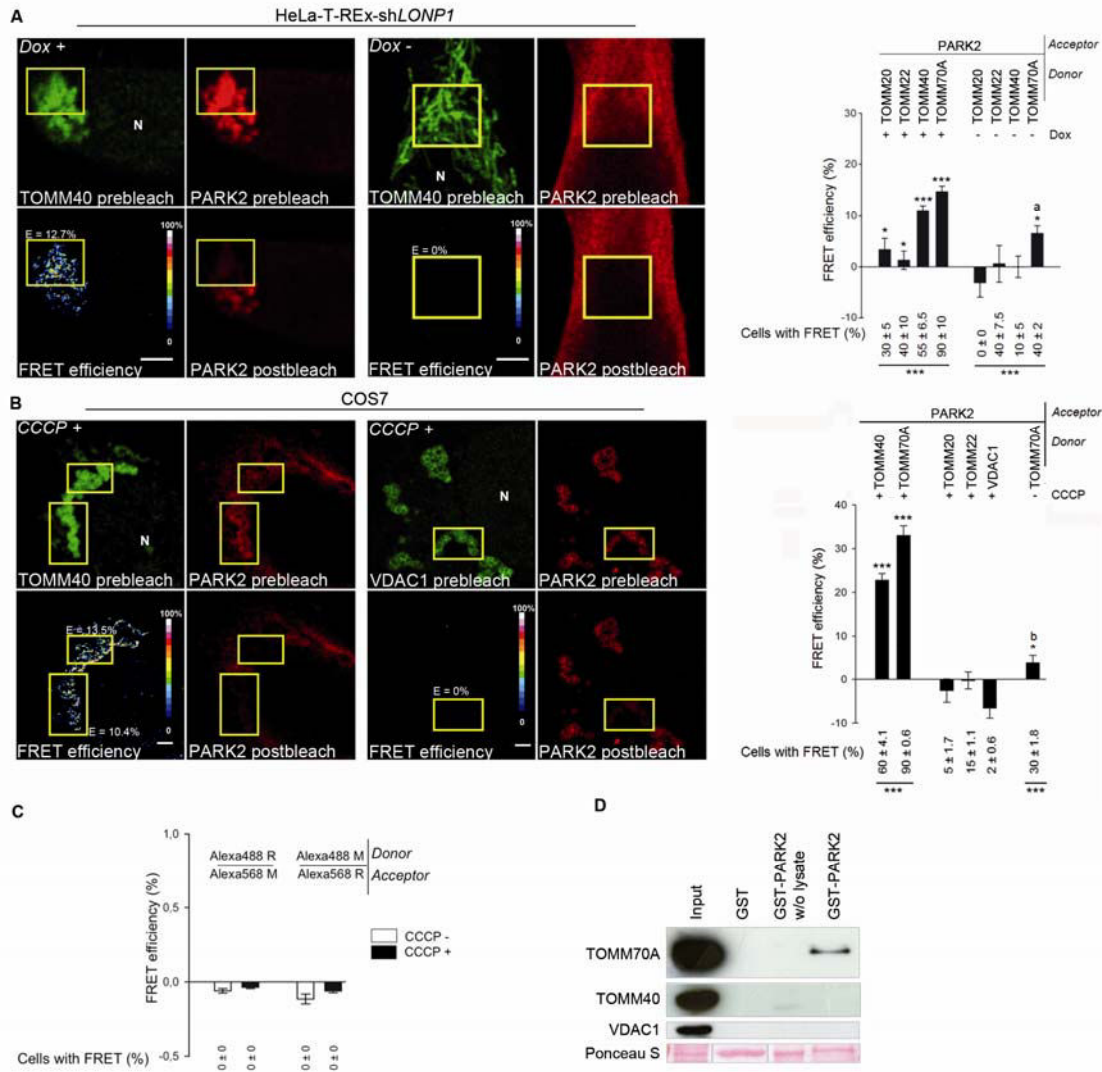


Figure S2. PARK2 interacts with the TOMM machinery in various models of mitochondrial import blockade. Representative FRET images and quantitative analysis of FRET efficiencies for the indicated donor-acceptor pairs in **(A)** HeLa-T-Rex-shLONP1 cells with and without Dox treatment or **(B)** COS7 cells with and without CCCP treatment. Comparisons were made with the TOMM40-PARK2 pair in the “Dox -” condition (*) or versus the corresponding “Dox +” condition (a) in **(A)**, and with the VDAC1-PARK2 donor-acceptor pair (*) or the corresponding “CCCP +” condition (b) in **(B)**. Pseudocolor scale: pixel-by-pixel FRET efficiencies. E: mean FRET efficiency within the ROI. N: nucleus. $n = 10$ to 20 cells per condition from one experiment representative of three. *, a, b $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. **(C)** FRET

analysis of COS7 cells overproducing PARK2, treated or untreated with CCCP and immunostained with secondary antibodies only. M: anti-mouse IgG; R: anti-rabbit IgG. $n = 10$ cells from one representative experiment out of three. **(D)** Specific pull-down of TOMM70A but not TOMM40 or VDAC1 by a recombinant GST-tagged PARK2 protein incubated with total lysates from COS7 cells. Ponceau S illustrates the recombinant GST and GST-PARK2 proteins in the pull-down assay (5 μg). Input corresponds to an aliquot of the lysate (40 μg) prior to pull-down. w/o: pull-down without cell lysate. Results from one representative experiment out of three. Scale bar, 10 μm .

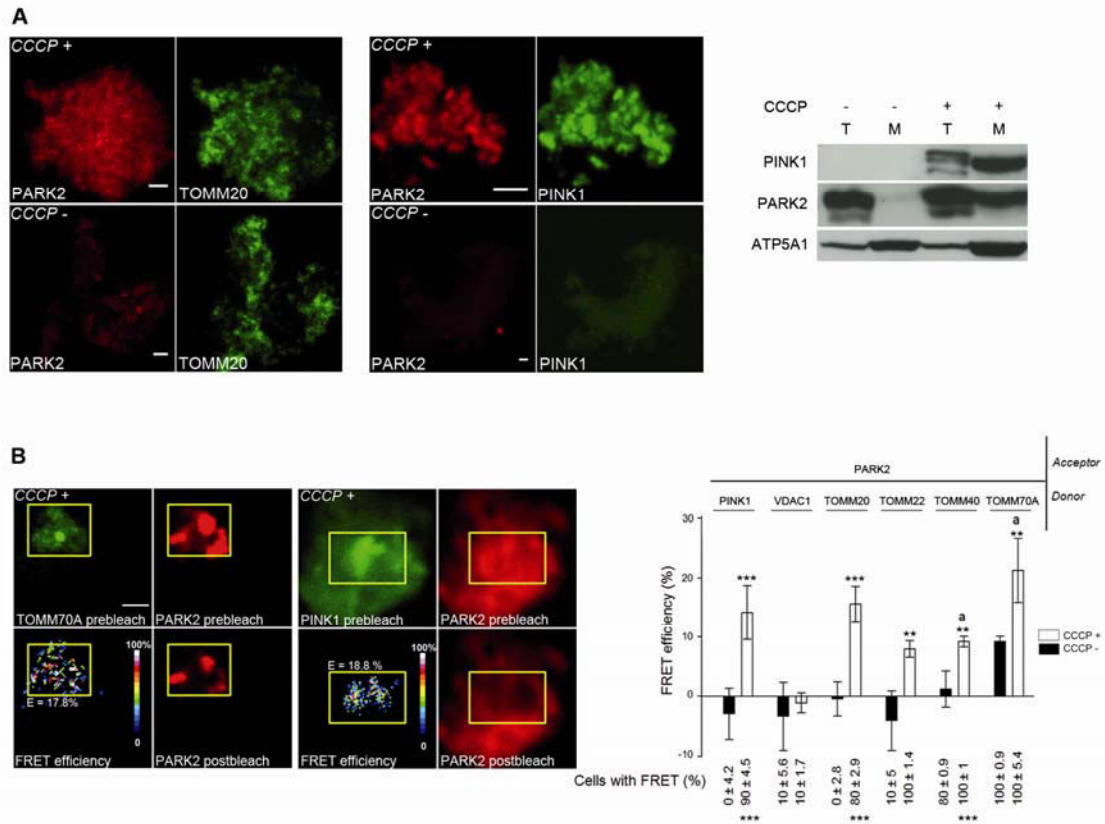


Figure S3. PARK2 interacts with the TOMM machinery in mitochondrion-enriched fractions. **(A)** Representative images and western blots showing mitochondrial accumulation of endogenous PINK1 and PARK2 in mitochondrion-enriched fractions from HEK293T cells treated with CCCP. (T): total protein extracts; (M): mitochondrion-enriched fraction. Western blotting for ATP5A1 confirms mitochondrial enrichment in M. **(B)** Representative FRET images, quantitative analysis of FRET efficiencies and percentage of ROIs with FRET in enriched mitochondrial fractions from HEK293T cells. $n = 5$ to 10 ROIs per condition from one experiment representative of two. Comparisons were made with VDAC1-PARK2 in “CCCP+” conditions (*) or corresponding “CCCP-” condition (a). **, $a_p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Scale bar, 3 μm .

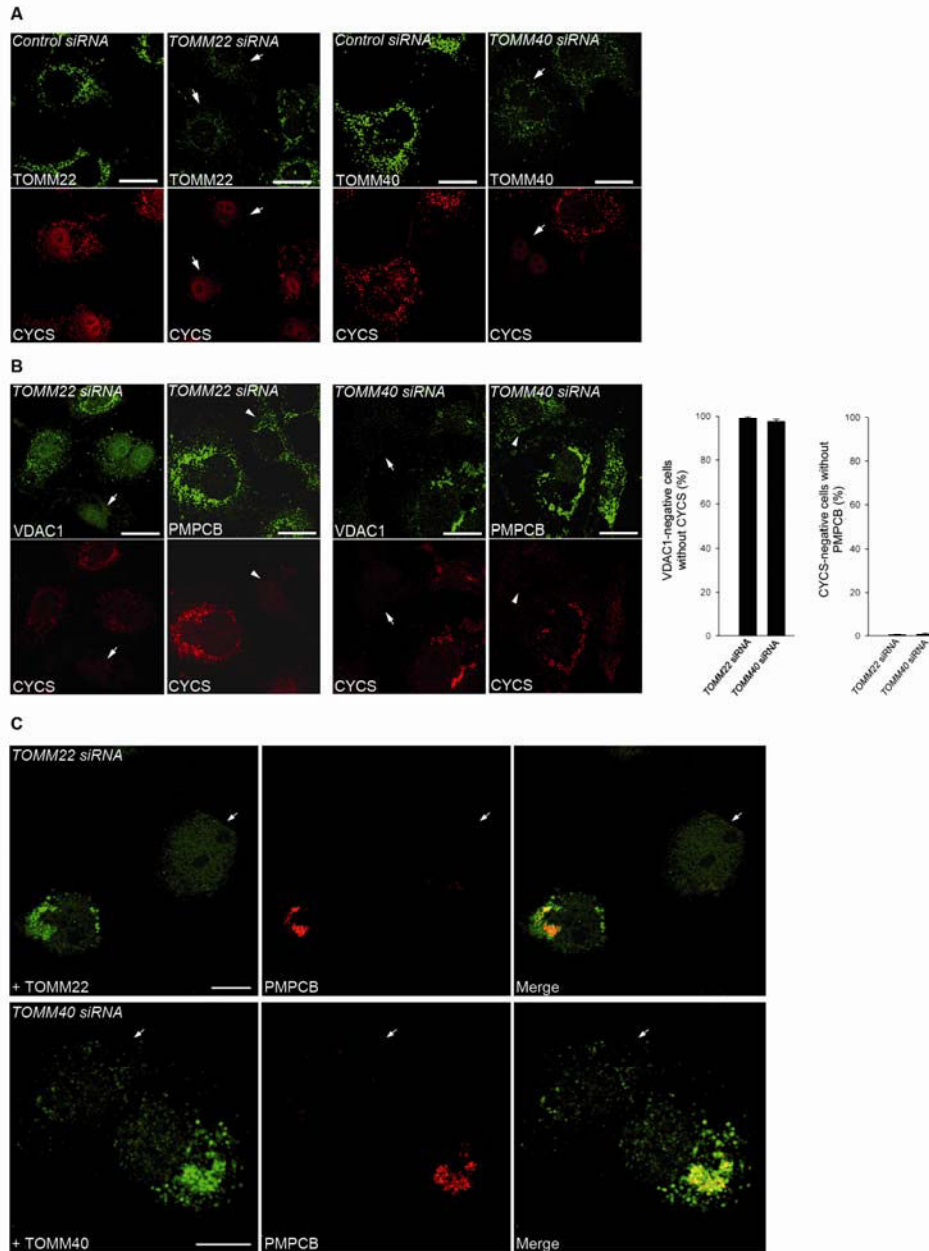


Figure S4. Silencing of *TOMM40* or *TOMM22* initiates mitochondrial clearance. **(A)** Fate of CYCS in cells with low *TOMM22* or *TOMM40* levels. **(B)** Representative images and corresponding quantifications illustrating the concomitant loss of CYCS and VDAC1 (arrows), but not PMPCB (arrowheads), in cells treated with the indicated siRNAs. $n = 3$ to 5 independent wells from one experiment representative of three. **(C)** Representative images illustrating the presence of mitochondria immunostained for PMPCB after CCCP treatment in cells silenced for *TOMM22* or *TOMM40* and transfected to express the corresponding siRNA-resistant cDNAs. Arrows: PARK2-positive cells not

overproducing the corresponding TOMM subunit and showing loss of PMPCB staining. Scale bar, 10 μm .

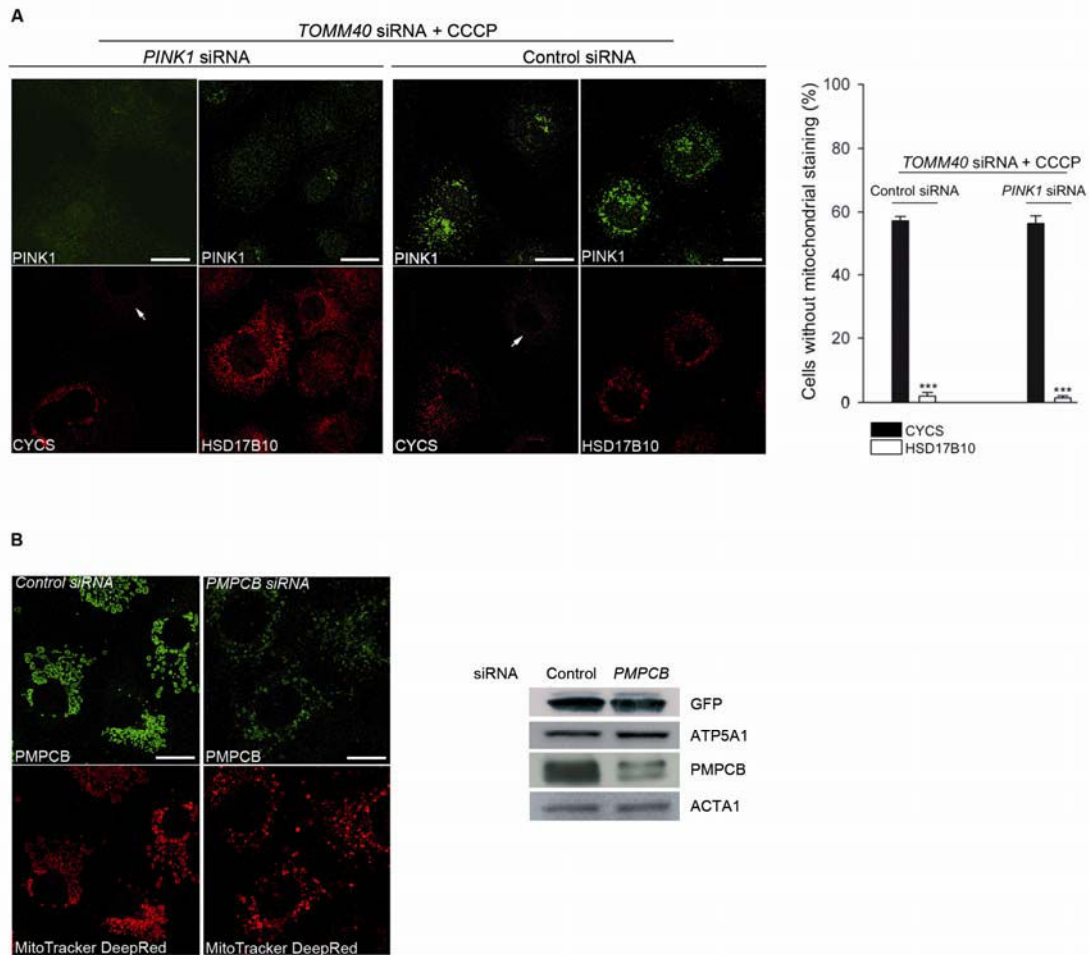


Figure S5. Depletion of subunits of the TOMM machinery leads to CYCS clearance in cells silenced for *PINK1*. **(A)** Representative images illustrating the fate of the mitochondrial markers CYCS or HSD17B10 (matrix marker) in COS7 cells with low TOMM40 levels and with or without *PINK1* silencing, and corresponding quantitative analysis. Arrows: loss of CYCS. $n = 3$ to 5 independent wells from one experiment representative of three. $***p < 0.001$ versus the “CYCS” condition. **(B)** Representative images illustrating the efficacy of *PMPCB* gene downregulation in COS7 cells. Mitochondria were labeled with MitoTracker DeepRed. Western blot analyses: mitochondrial import impairment of mitoGFP in total extracts from COS7 cells with lower *PMPCB* levels. Loading controls: ATP5A1, ACTA1. Scale bar, 10 μm .

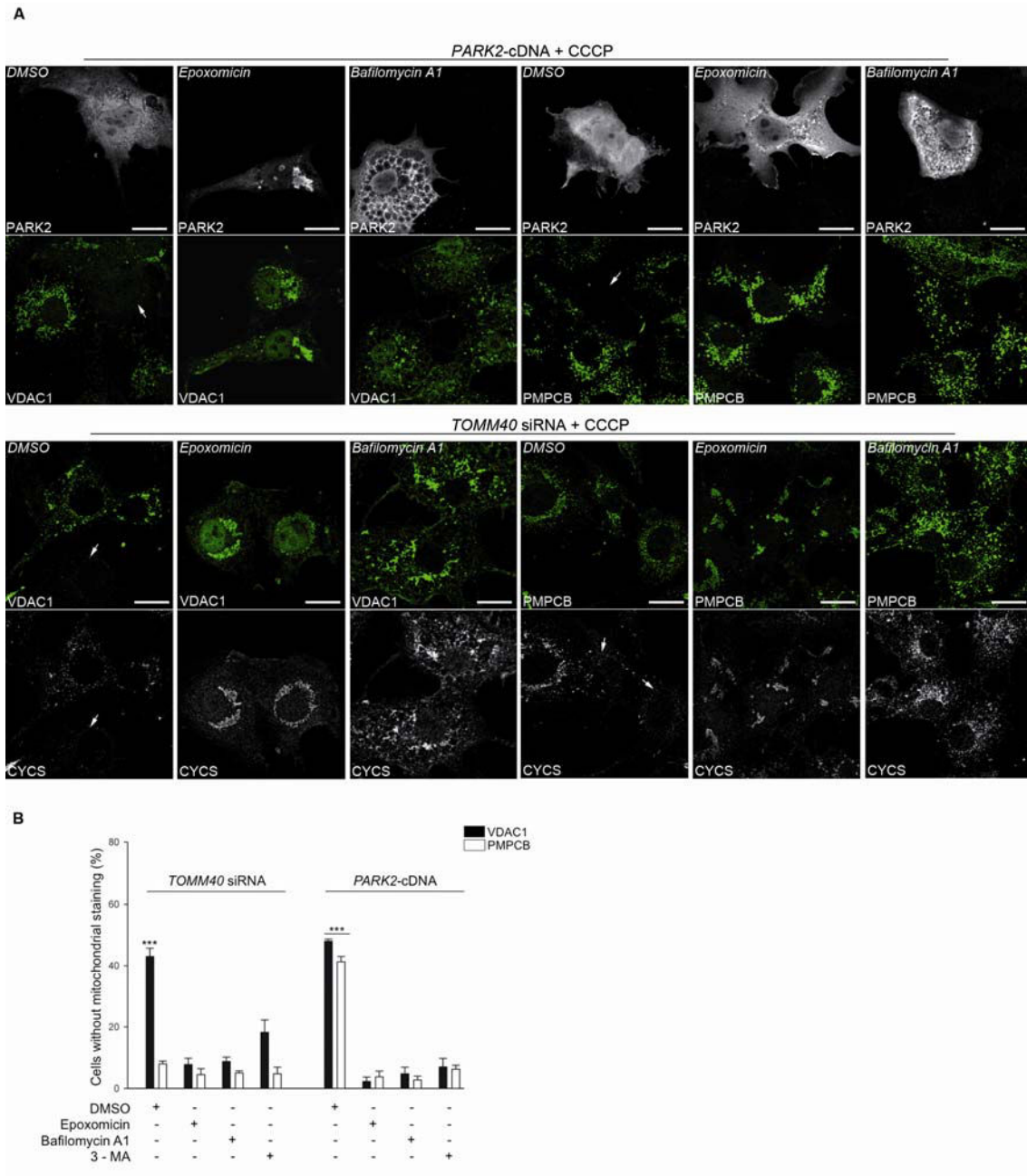


Figure S6. The proteasome and lysosome are required for OMM proteolysis and whole-organelle clearance. (A) Representative images illustrating the fate of mitochondrial markers in COS7 cells overproducing PARK2 or with low TOMM40 levels after CCCP treatment and the addition of the vehicle DMSO, the proteasome inhibitor epoxomicin or the lysosome inhibitor bafilomycin A₁, to the culture

medium. Arrows: loss of mitochondrial markers. (B) Percentage of cells without VDAC1 or PMPCB immunostaining in cells transfected and treated as in (A) or with the inhibitor of autophagosome formation, 3-methyladenine. $n = 3$ independent wells from one experiment representative of four. $***p < 0.001$ versus all other conditions in each paradigm. Scale bar, 10 μm .

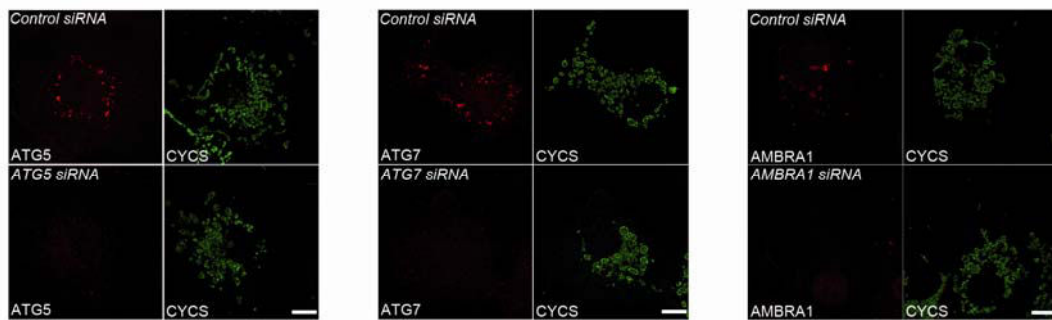


Figure S7. siRNA-mediated silencing of *TOMM40* initiates PARK2-dependent mitophagy. Representative images illustrating the efficacy of the downregulation strategies in COS7 cells transfected with the indicated siRNAs and stained for CYCS and the corresponding autophagy marker. Scale bar, 10 μm .

I.2. La Parkine contrôle l'adressage mitochondrial de son substrat, l'enzyme HSD17 β 10

Article 2 : **Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-related enzyme 17- β hydroxysteroid dehydrogenase type 10.** (Cell Death Differ. 2015 Oct;22(10):1563-76)

L'analyse protéomique de souris déficientes en Parkine dont les travaux ont été publiés en 2005 [Periquet *et al.*, 2005], a permis de mettre en évidence un nombre important de protéine *up*- ou *down*-régulées en comparaison à des souris contrôles. Parmi ces protéines, l'enzyme mitochondriale multifonctionnelle HSD17 β 10 (17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 10), catalysant l'oxydation de stéroïdes neuroactifs ainsi que la dégradation de l'isoleucine se trouve être *up*-régulée dans le cortex et le striatum de souris déficientes en Parkine. HSD17 β 10 est une enzyme essentielle à la physiologie mitochondriale déjà impliquée comme protectrice contre une réponse apoptotique due à un traitement au MPTP chez la souris [Rauschenberger *et al.*, 2010 ; Tieu *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2005].

Dans cet article que je co-signe en premier auteur, nous montrons que cette protéine est diminuée en quantité dans le striatum de patients parkinsoniens en comparaison à des individus contrôles, et que si ses niveaux sont augmentés dans des fractions totales de cerveau chez la souris, ils sont significativement diminués dans des fractions mitochondriales. Nous montrons également par la technique de *GST-pulldown* que la Parkine interagit directement avec HSD17 β 10 pour l'ubiquityler.

Dans des cellules de mammifères, j'ai montré que diminuer l'expression de la Parkine par ARN interférence, ou surexprimer une ubiquitine incapable de s'intégrer dans des chaînes longues, conduit à une diminution de la quantité mitochondriale d'HSD17 β 10, ce qui suggère que la Parkine facilite son import par un processus qui nécessiterait son ubiquitylation.

De manière intéressante et complémentaire aux résultats obtenus cités ci-

dessus avec le MPTP, j'ai montré que surexprimer HSD17 β 10 dans des cellules est protecteur vis-à-vis de la mitophagie Parkine-dépendante. Cette protection passerait par une hyperfusion mitochondriale, précédemment montrée comme améliorant la réponse bioénergétique mitochondriale en conditions de stress et comme protégeant les mitochondries contre une dégradation par mitophagie [Gomes *et al.*, 2011 ; Rambold *et al.*, 2011 ; Tondera *et al.*, 2009], car la surexpression de la protéine Drp1 abolit son effet protecteur.

Basé sur ces observations, nous proposons que PINK1 et Parkine contribuent au maintien des niveaux mitochondriaux de son substrat, l'enzyme HSD17 β 10, possiblement en modulant son import à travers la machinerie TOM. Cet effet sur l'import pourrait être un nouveau mécanisme par lequel la Parkine et PINK1 coopèrent pour préserver l'homéostasie mitochondriale, et où son défaut résulterait en des quantités mitochondriales basses d'HSD17 β 10, contribuant à une vulnérabilité neuronale dans les formes autosomiques récessives de maladies de Parkinson.

Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-related enzyme 17- β hydroxysteroid dehydrogenase type 10

G Bertolin^{1,2,3,4,10}, M Jacoupy^{1,2,3,4,10}, S Traver^{5,10}, R Ferrando-Miguel^{1,2,3,4}, T Saint Georges^{1,2,3,4}, K Grenier⁶, H Ardila-Osorio^{1,2,3,4}, M-P Muriel^{1,2,3,4}, H Takahashi⁷, AJ Lees⁸, C Gautier⁹, D Guedin⁹, F Coge⁹, EA Fon⁶, A Brice^{1,2,3,4} and O Corti^{1,2,3,4}*

Mutations of the *PARK2* and *PINK1* genes, encoding the cytosolic E3 ubiquitin-protein ligase Parkin and the mitochondrial serine/threonine kinase PINK1, respectively, cause autosomal recessive early-onset Parkinson's disease (PD). Parkin and PINK1 cooperate in a biochemical mitochondrial quality control pathway regulating mitochondrial morphology, dynamics and clearance. This study identifies the multifunctional PD-related mitochondrial matrix enzyme 17- β hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (HSD17B10) as a new Parkin substrate. Parkin overproduction in cells increased mitochondrial HSD17B10 abundance by a mechanism involving ubiquitin chain extension, whereas *PARK2* downregulation or deficiency caused mitochondrial HSD17B10 depletion in cells and mice. HSD17B10 levels were also found to be low in the brains of PD patients with *PARK2* mutations. Confocal and Förster resonance energy transfer (FRET) microscopy revealed that HSD17B10 recruited Parkin to the translocase of the outer membrane (TOM), close to PINK1, both in functional mitochondria and after the collapse of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). PD-causing *PARK2* mutations impaired interaction with HSD17B10 and the HSD17B10-dependent mitochondrial translocation of Parkin. HSD17B10 overproduction promoted mitochondrial elongation and mitigated CCCP-induced mitochondrial degradation independently of enzymatic activity. These effects were abolished by overproduction of the fission-promoting dynamin-related protein 1 (Drp1). By contrast, siRNA-mediated *HSD17B10* silencing enhanced mitochondrial fission and mitophagy. These findings suggest that the maintenance of appropriate mitochondrial HSD17B10 levels is one of the mechanisms by which Parkin preserves mitochondrial quality. The loss of this protective mechanism may contribute to mitochondrial dysfunction and neuronal degeneration in autosomal recessive PD.

Cell Death and Differentiation advance online publication, 16 January 2015; doi:10.1038/cdd.2014.224

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative movement disorder. It is caused by progressive loss of the dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta*. It is mostly sporadic, but about 10% of cases are familial forms with Mendelian inheritance.¹ Autosomal recessive forms of PD are caused by mutations of *PARK2/parkin*, *PINK1*, *DJ-1* and *ATP13A2*. *PARK2* mutations are responsible for almost 40% of cases beginning before the age of 45. Parkin is a cytosolic RING-in-between-RING ubiquitin ligase with HECT-like enzyme activity;² it has versatile ubiquitylation activities and various putative protein substrates with diverse functions, involved in different cellular processes.¹ Genetic studies in *Drosophila* have shown Parkin and the mitochondrial serine/threonine kinase PINK1 to be components of a molecular pathway maintaining mitochondrial physiology.^{3–7}

In mammalian cells, PINK1 and Parkin cooperate in the clearance of dysfunctional mitochondria. The disruption of mitochondrial membrane (MM) potential ($\Delta\Psi_m$) by uncouplers or oxidative stress leads to PINK1 accumulation on the outer MM (OMM), the PINK1-dependent recruitment and activation of Parkin, the ubiquitylation and proteasome-dependent degradation of nearby substrates, and the initiation of mitophagy.^{1,8–12} A series of mitochondrial targets interact with or are ubiquitylated by Parkin early in mitochondrial clearance.^{9,13–19} There is considerable interest in the possible direct role of some of these proteins in Parkin-dependent mitochondrial degradation, particularly for Mitofusin 1/2,^{13,20} VDACs,^{9,17} hexokinases 1/2^{16,19} and subunits of the translocase of the OMM (TOM).^{21,22} Moreover, the constitutive association of some Parkin with the OMM raises the question

¹Inserm, U1127, 75013 Paris, France; ²CNRS, UMR 7225, 75013 Paris, France; ³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1127, 75013 Paris, France; ⁴Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, 75013 Paris, France; ⁵CHU Montpellier, Institute for Research in Biotherapy, Saint-Eloi Hospital, Montpellier, France; ⁶McGill Parkinson Program, Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; ⁷Department of Pathology, Brain Research Institute, University of Niigata, Niigata, Japan; ⁸Reta Lila Weston Institute for Neurological Studies, Institute of Neurology, University College London, London, UK and ⁹Laboratoire Chémogénétique Servier-Diverchim, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, Paris, France

*Corresponding author: O Corti, Molecular Basis, Physiopathology and Treatment of Neurodegenerative Diseases; Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France. Tel: +33 15 72 74 651; Fax: +33 15 72 74 795. E-mail: olga.corti@upmc.fr

¹⁰These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: APEX, pea L-ascorbate peroxidase (K14D, W41F, E112K) variant; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial membrane potential; DAB, diaminobenzidine; DLST, dihydrolipoamide S-succinyl transferase; Dox, doxycycline; Drp1, Dynamin-related protein 1; FRET, Förster's resonance energy transfer; HSD17B10, 17- β hydroxysteroid dehydrogenase type 10; OMM, outer mitochondrial membrane; MM, mitochondrial membrane; PINK1, PTEN-induced putative kinase 1; PMPCB, mitochondrial processing peptidase subunit B; TOM, translocase of the outer membrane; VDAC1, voltage-dependent anion channel 1

Received 29.10.13; revised 8.10.14; accepted 25.11.14; Edited by L Scorrano

of a potential role of this protein in functions unrelated to mitophagy, such as regulating the degradation or targeting of specific mitochondrial proteins.²³

We report here the identification of a new mitochondrial Parkin substrate, the nucleus-encoded mitochondrial matrix 17- β hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (HSD17B10), also known as endoplasmic reticulum-associated amyloid-beta-binding protein (ERAB), A β -binding alcohol dehydrogenase (ABAD) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (HADH2).^{24,25} HSD17B10 is a ubiquitous NADH-dependent multifunctional enzyme essential for mitochondrial maintenance and cell viability.^{25,26} It is involved primarily in isoleucine catabolism, in which it dehydrogenates 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA (MHB),²⁷ but it has other substrates, including fatty acids and steroids, in several pathways.²⁵ It is one of the three protein components of human mitochondrial RNase P, which is required for the processing of mtDNA transcripts.²⁸ *HSD17B10* mutations cause a rare X chromosome-linked inborn error of metabolism, with classical neonatal and infantile forms associated with rapid, progressive neurodegeneration, and atypical juvenile and asymptomatic forms.^{24,27} HSD17B10 is also thought to have a role in adult-onset neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, in which it may mediate amyloid β -driven mitochondrial toxicity,^{25,29,30} and PD, in which it is downregulated in the ventral midbrain.³¹

We and others have generated and characterized *PARK2* knockout mice. These models did not show overt signs of neurodegeneration, but they presented neurochemical, biochemical and behavioral alterations reminiscent of preclinical dysfunction.^{32–38} We identified HSD17B10 as one of the proteins differentially expressed between *PARK2* knockout and wild-type mice.³⁷ Here, we provide evidence that Parkin increases the mitochondrial availability of HSD17B10 in a ubiquitin-dependent manner. HSD17B10 promoted mitochondrial elongation, sparing these organelles from degradation triggered by the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). Our results suggest that the maintenance of appropriate HSD17B10 levels may be a new mechanism by which Parkin preserves mitochondrial homeostasis.

Results

HSD17B10, a mitochondrial enzyme displaying abundance changes in Parkin-deficient mice, is a Parkin substrate. Using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry, we previously identified HSD17B10 as a protein moderately upregulated (30%) in total fractions from the cortex and striatum of young and aged non-symptomatic *PARK2* knockout mice (Periquet *et al.*³⁷ and data not shown). For confirmation of these findings, we carried out western blots to compare the abundance of HSD17B10 in pure mitochondrial fractions from the whole brains of *PARK2*-deficient and wild-type mice. HSD17B10 levels in knockout mice were half those in wild-type mice, but were slightly higher in total brain fractions (Figure 1a), as in our previous proteomic study, possibly reflecting an adaptive mechanism aimed at restoring normal protein levels.³⁷ Consistent with previous reports in sporadic PD,³¹ HSD17B10 levels also tended to be

lower in total striatal extracts from two PD patients with *PARK2* mutations than in those of unaffected subjects (Figure 1b), indicating that at this stage of overt neurodegeneration, compensation may become inefficient.

We then investigated whether Parkin interacted directly with HSD17B10, promoting its ubiquitylation. A recombinant GST-tagged Parkin protein precipitated endogenous HSD17B10 from whole-cell lysates (Figure 1c). In a purely *in vitro* assay, GST-Parkin promoted the generation of a HSD17B10-immunoreactive species with an apparent molecular mass compatible with monoubiquitylated HSD17B10 (Figure 1d). No such effect was observed with the enzymatically inactive C431F variant. COS7 cells coproducing HSD17B10, ubiquitin and Parkin, also generated ubiquitylated species of sizes consistent with mono- and polyubiquitylated HSD17B10 (Figure 1e).

Parkin increases the mitochondrial abundance of HSD17B10 in a ubiquitin-dependent manner.

We investigated whether changes in HSD17B10 abundance reflected direct regulation by Parkin rather than compensatory mechanisms in response to chronic Parkin deficiency, by studying the effect of dynamic modulations of Parkin abundance on the mitochondrial targeting of exogenous HSD17B10 in mammalian cells. Human HSD17B10 and a mitochondrion-targeted green fluorescent protein (mitoGFP) were overproduced in rat PC12 cells producing human Parkin under the control of the *tet-off* gene regulatory system (PC12-*tet-off*-Parkin).²³ Quantitative western blot analysis revealed a doubling of the ratio of HSD17B10 to mitoGFP levels in mitochondrion-enriched fractions from cells overproducing Parkin (Figure 2a, Dox –). This difference was abolished by treating the cells with CCCP, which dissipates the $\Delta\Psi_m$ required for protein import.

Parkin silencing decreased intramitochondrial HSD17B10 levels by 15% in HEK293T cells (Figure 2b; Supplementary Figure S1a). *PINK1* silencing resulted in a similar decrease (Supplementary Figures S1b and S2d). We investigated the role of ubiquitylation, by evaluating the impact of overproducing a lysine-less ubiquitin variant (UbiK0) inhibiting ubiquitin chain extension, or of the proteasome inhibitor epoxomicin. UbiK0 decreased mitochondrial HSD17B10 levels to a similar extent to *PARK2* downregulation (Figure 2b). It also exacerbated the effect of Parkin depletion, resulting in a decrease in HSD17B10 levels of almost 50%. Epoxomicin treatment increased the abundance of HSD17B10 in the cytosol but had no effect on mitochondria (Supplementary Figure S1c).

UbiK0 overproduction led to the generation of an HSD17B10 protein with a molecular mass compatible with monoubiquitylation, consistent with impaired ubiquitin chain extension (Figure 2c). This protein was found in the mitochondrial fraction but not in the cytosol, and was absent from cells treated with epoxomicin, even after long exposure times (Figures 2c and d). It also disappeared following the limited trypsin digestion of mitochondrial fractions to eliminate proteins associated with the OMM (Supplementary Figure 1d).

HSD17B10 recruits Parkin to the mitochondrion in a PINK1-dependent manner, without promoting mitophagy.

We then analyzed the subcellular distribution of HSD17B10 and Parkin in COS7 cells. When overproduced alone,

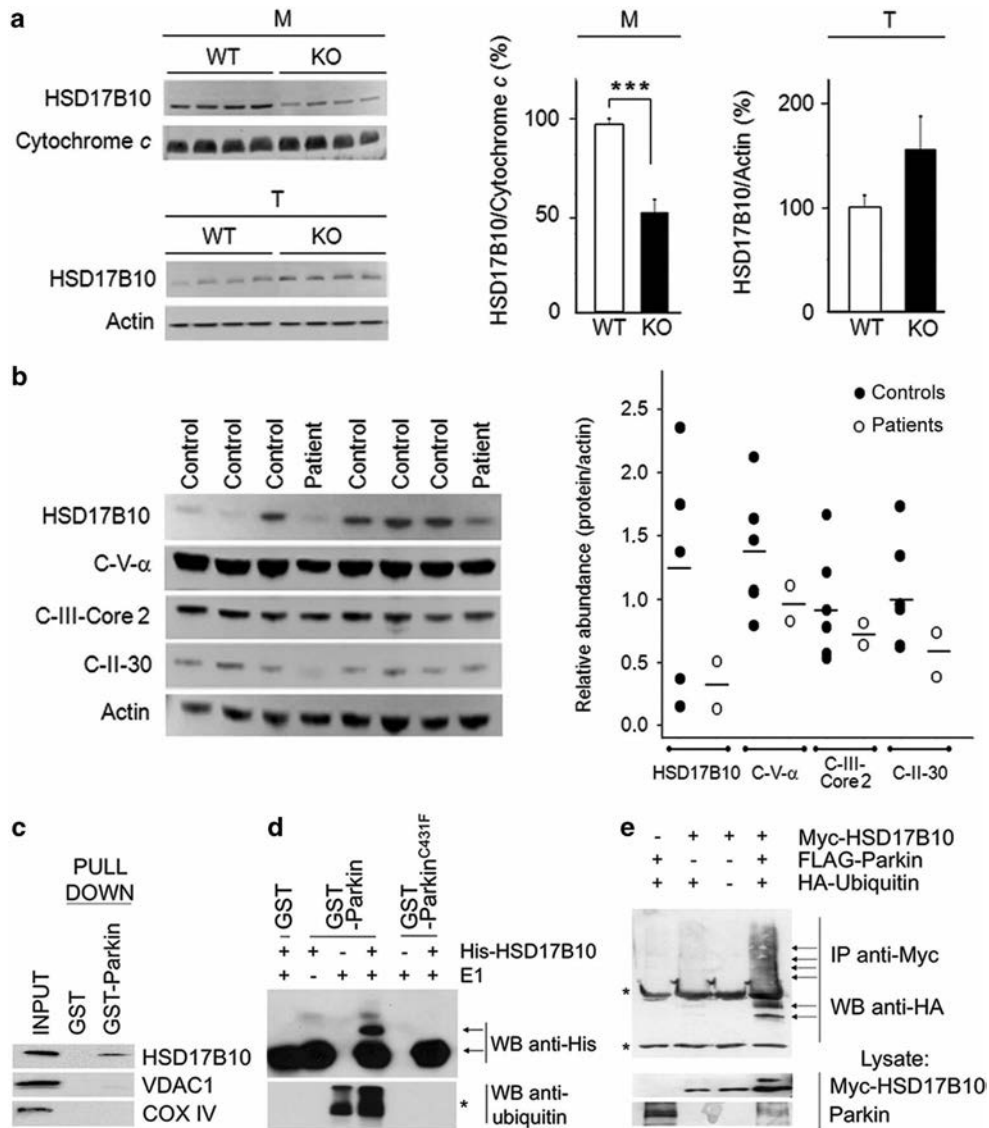


Figure 1 Parkin modulates the levels of its substrate HSD17B10 in the brain. (a, b) Abundance of HSD17B10 or of respiratory chain complex subunits (Complex V subunit α , C-V- α ; Complex III subunit Core 2, C-III-Core 2; Complex II subunit 30 KDa, C-II-30) in (a) pure brain mitochondria (M) or total brain extracts (T) from *PARK2* knockout (KO) and wild-type (WT) mice ($n = 11-15$) or (b) extracts from the striatum of PD patients with *PARK2* mutations ($n = 2$) and controls ($n = 6$). Loading controls were cytochrome *c* and/or actin. The results in (a) are expressed as means \pm S.E.M. $***P < 0.001$. (c) GST pull-down assay illustrating the specific interaction between Parkin and HSD17B10 in lysates from COS7 cells. No interaction was observed between Parkin and VDAC1 or the subunit VIb of mitochondrial complex IV. (d) Purely *in vitro* ubiquitylation assay, showing the appearance of a HSD17B10 species compatible with monoubiquitylation in the presence of Parkin, but not in the presence of the enzymatically inactive C431F variant. This species is not observed in the absence of the ubiquitin-activating enzyme E1. *Anti-ubiquitin western blot showing autoubiquitylated Parkin. (e) Ubiquitylation of HSD17B10 by Parkin in COS7 cells overproducing the protein alone or with Parkin and/or HA-tagged ubiquitin. Ubiquitin-positive bands appear in affinity-purified HSD17B10 fractions only in the presence of Parkin (arrows). Asterisks indicate light and heavy IgG chains. IP, immunoprecipitation; WB, western blot

HSD17B10 was associated with the mitochondrial reporter MitoTracker DeepRed, whereas exogenous Parkin was predominantly cytosolic (Supplementary Figure S2a). When coproduced with HSD17B10, but not with the Krebs cycle enzyme dihydrolipoamide S-succinyl transferase (DLST) or with mitoGFP, Parkin was recruited to the mitochondria in a large proportion of cells, resulting in the perinuclear aggregation and ubiquitylation of the organelles (Figures 3a and b; Supplementary Figures S2b and c). PD-causing *PARK2* mutations prevented these events, possibly due to weakened interaction between HSD17B10 and Parkin, or

lack of ubiquitylation (Figure 3c). Recruitment of Parkin by HSD17B10 was also abolished in cells depleted for PINK1 (Figure 3d; Supplementary Figure S2d). Moreover, ubiquitin overproduction mitigated mitochondrial aggregation, whereas UbiK0 enhanced this process, suggesting that this aggregation was due to the impairment of downstream mechanisms (Figure 3e).

The mitochondrial recruitment of Parkin and organelle clustering resemble the events observed after $\Delta\Psi_m$ collapse.⁸ However, in cells overproducing HSD17B10, Parkin was translocated to mitochondria in which $\Delta\Psi_m$ was

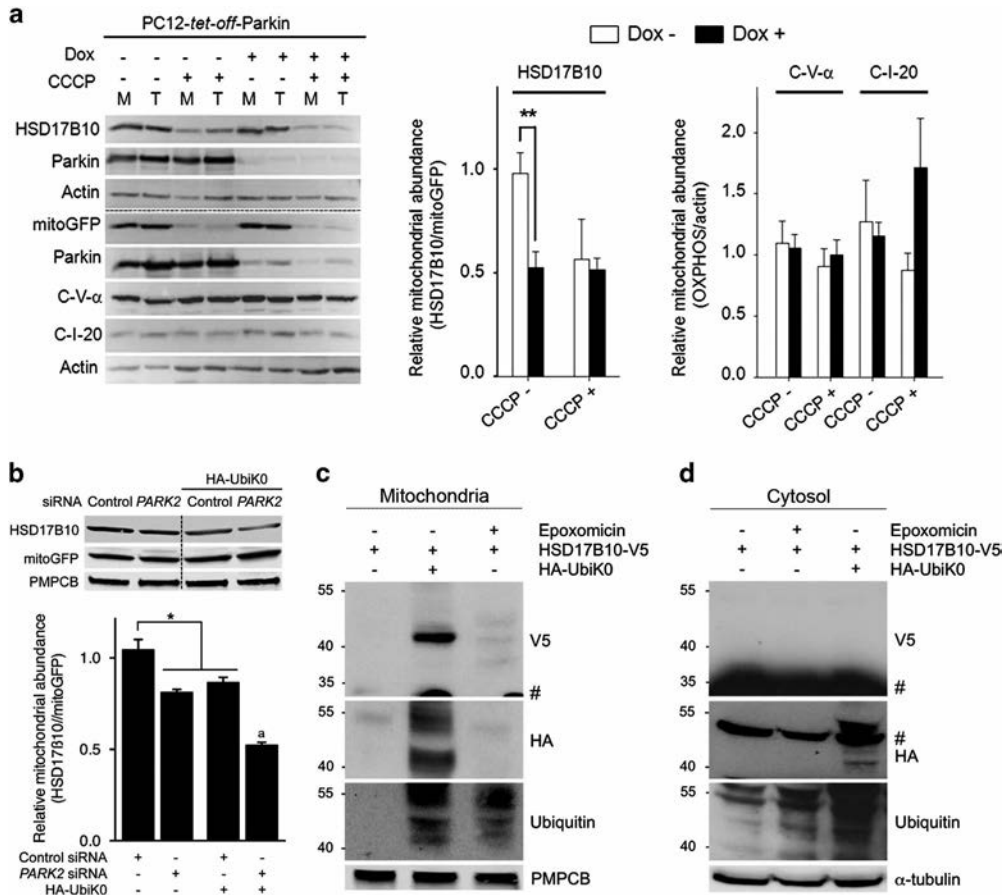


Figure 2 Mitochondrial HSD17B10 levels are regulated by Parkin and ubiquitin. (a) Effect of Parkin on the mitochondrial abundance (M/T; means \pm S.E.M.) of newly synthesized HSD17B10 relative to mitoGFP ($n=4$ independent experiments), or of endogenous subunits of respiratory chain complex I or V relative to actin in PC12-*tet-off-Parkin* cells ($n=7$ independent experiments). M, mitochondrion-enriched fractions; T, total cell fractions; Dox, doxycycline. (b) Effect of the siRNA-mediated downregulation of *PARK2* or the overexpression of UbiK0 on the abundance of HSD17B10 relative to mitoGFP in mitochondrion-enriched fractions from HEK293T cells subjected to trypsin digestion. The mitochondrial matrix protease PMPCB was used as a loading control. $n=4$ independent experiments. Results are expressed as means \pm S.E.M.. * $P<0.05$, ** $P<0.01$; ^a $P<0.01$ versus *PARK2* siRNA and HA-UbiK0. (c, d) Western blot analysis showing the appearance of a HSD17B10 species compatible with monoubiquitylation specifically in mitochondrion-enriched fractions (1 min exposure) and not in cytosol (2 h exposure) from HEK293T cells overproducing UbiK0 but not in cells treated with epoxomicin. #Signal corresponding to unmodified HSD17B10 on the V5 blot (c, d), or residual signal corresponding to α -tubulin on the HA blot in (d)

preserved, as shown by MitoTracker CMX-ROS or TMRM staining (Figure 3a; Supplementary Figure S2e). Parkin is recruited to mitochondria with preserved $\Delta\Psi_m$ by PINK1, particularly when mitochondrial import is blocked.^{22,39,40} PINK1 accumulated on mitochondria in cells overproducing HSD17B10, indicating that mitochondrial import mechanisms were overwhelmed (Supplementary Figure S2f). However, LC3-positive autophagic vesicles and immunoreactivity to the autophagic adaptor SQSTM1/p62 were rarely associated with mitochondrial clusters in cells coproducing HSD17B10 and Parkin, indicating an absence of mitophagy in these cells (Supplementary Figure S3). CCCP-induced mitochondrial aggregation is dependent on active transport along the microtubule network toward the perinuclear region, facilitating mitochondrial degradation by autophagy.¹² By contrast, in cells producing Parkin and HSD17B10, mitochondrial aggregation was not affected by cytoskeleton disruption, suggesting a passive process driven by protein–protein interactions at the OMM, as previously described for the mitochondrial shaping protein Mitofusin 2 (Supplementary Figure S4).⁴¹ Moreover,

ultrastructural analysis revealed morphologically normal mitochondria in these cells (Figure 3f). Parkin is not imported into mitochondria and HSD17B10 is synthesized in the cytosol.²⁵ These proteins may therefore interact at the OMM, before HSD17B10 import. Both these proteins were detected at the OMM in mitochondrial aggregates, at the interface between adjacent organelles (Figure 3g). By contrast, outside mitochondrial aggregates, HSD17B10 was found in the mitochondrial matrix, associated with the inner MM in some cases, consistent with the expected final destination of this protein (Figure 3h).^{25,31}

Our observations suggest that HSD17B10 overproduction overwhelms mitochondrial protein import mechanisms, leading to PINK1 accumulation at the OMM. Parkin recruitment and ubiquitylation may, in turn, facilitate HSD17B10 import.

HSD17B10 interacts with Parkin and PINK1 at the TOM machinery and mitigates the Parkin-dependent mitophagy triggered by CCCP. HSD17B10 is imported into mitochondria *via* the TOM complex, which is dedicated to the

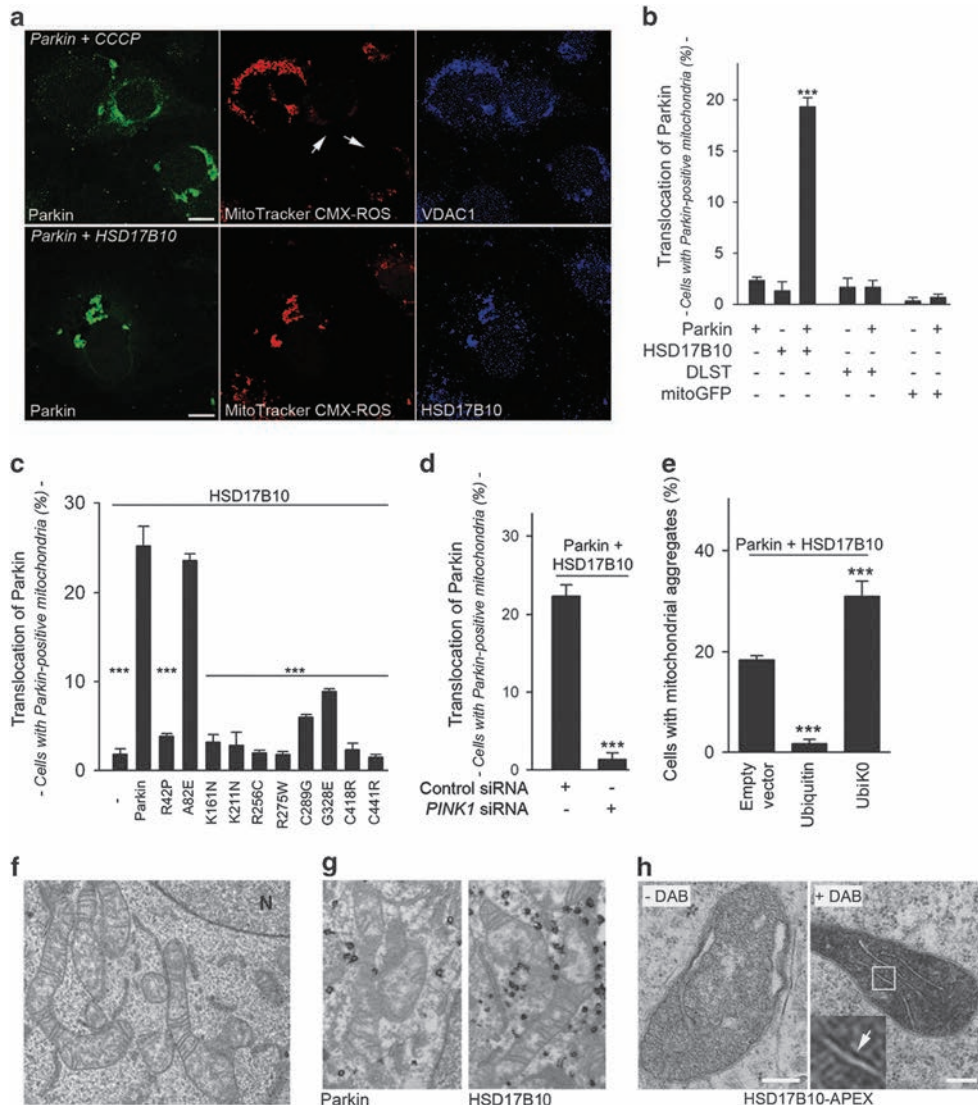


Figure 3 Parkin is recruited to the mitochondria by HSD17B10, in a PINK1-dependent manner. (a) Representative immunocytochemical staining showing the recruitment of exogenous Parkin to depolarized mitochondria in COS7 cells treated with CCCP for 6 h (upper panels; arrows), or to mitochondria with an intact membrane potential in cells overproducing HSD17B10 (lower panels). The treatments and transfection conditions are indicated in italics. Mitochondria were visualized with the potentiometric mitochondrial dye MitoTracker CMX-ROS and anti-VDAC1 or anti-HSD17B10 staining. Scale bar: 10 μ m. (b) Mitochondrial translocation of Parkin, quantified as the proportion of cells with Parkin-positive mitochondria. COS7 cells were transfected to overproduce Parkin alone or together with HSD17B10, DLST or mitoGFP. (c, d) Effect of PD-causing *PARK2* mutations (c) or *PINK1* silencing (d) on the mitochondrial recruitment of Parkin by exogenous HSD17B10 in COS7 cells, quantified as in (b). (e) Effect of exogenous ubiquitin or UbiK0 on mitochondrial aggregation in COS7 cells overproducing Parkin and HSD17B10. Results are expressed as means \pm S.E.M. for one experiment representative of six (b, c) or three (d, e) carried out, with $n = 60$ –100 cells per condition. *** $P < 0.001$ versus '+ Parkin' in (b); 'Parkin' in (c); 'Empty vector' in (e). (f, g) Micrograph showing the ultrastructure of mitochondria (f) the localization of Parkin and HSD17B10 on the outer surface of aggregated mitochondria, as revealed by immunogold staining (g), and the localization of HSD17B10-APEX in isolated mitochondria, as revealed by incubation with the peroxidase substrate diaminobenzidine (DAB)⁵⁸ (h) in COS7 cells. The arrow in the higher magnification of the framed region in (h) indicates the association of the staining with the inner MM. N, nucleus. Scale bar: 200 nm

import of most nucleus-encoded mitochondrial proteins,⁴² and Parkin and PINK1 associate with this complex.^{21,22} We investigated whether these proteins interacted close to the TOM machinery. We used Förster resonance energy transfer (FRET) microscopy, involving the detection of changes in donor fluorescence intensities after photobleaching of the acceptor, with donor/acceptor protein pairs labeled with appropriate secondary antibodies,^{22,43} to check for physical proximity (≤ 10 nm). In tests of representative donor/acceptor pairs in cells coproducing Parkin and HSD17B10, we detected FRET compatible with the formation of a complex

between these proteins and PINK1 at the TOM machinery (Figures 4a and b). UbiK0 overproduction compromised FRET between these molecular partners, demonstrating the need for ubiquitin chain extension (Figure 4c).

The association of Parkin and PINK1 at the TOM machinery after mitochondrial import blockade is a key step initiating the clearance of dysfunctional mitochondria after CCCP treatment.²² We therefore investigated whether HSD17B10 was also recruited to this complex in these conditions. Representative interactions between Parkin, HSD17B10, PINK1 and the TOM machinery were detected after CCCP treatment. These

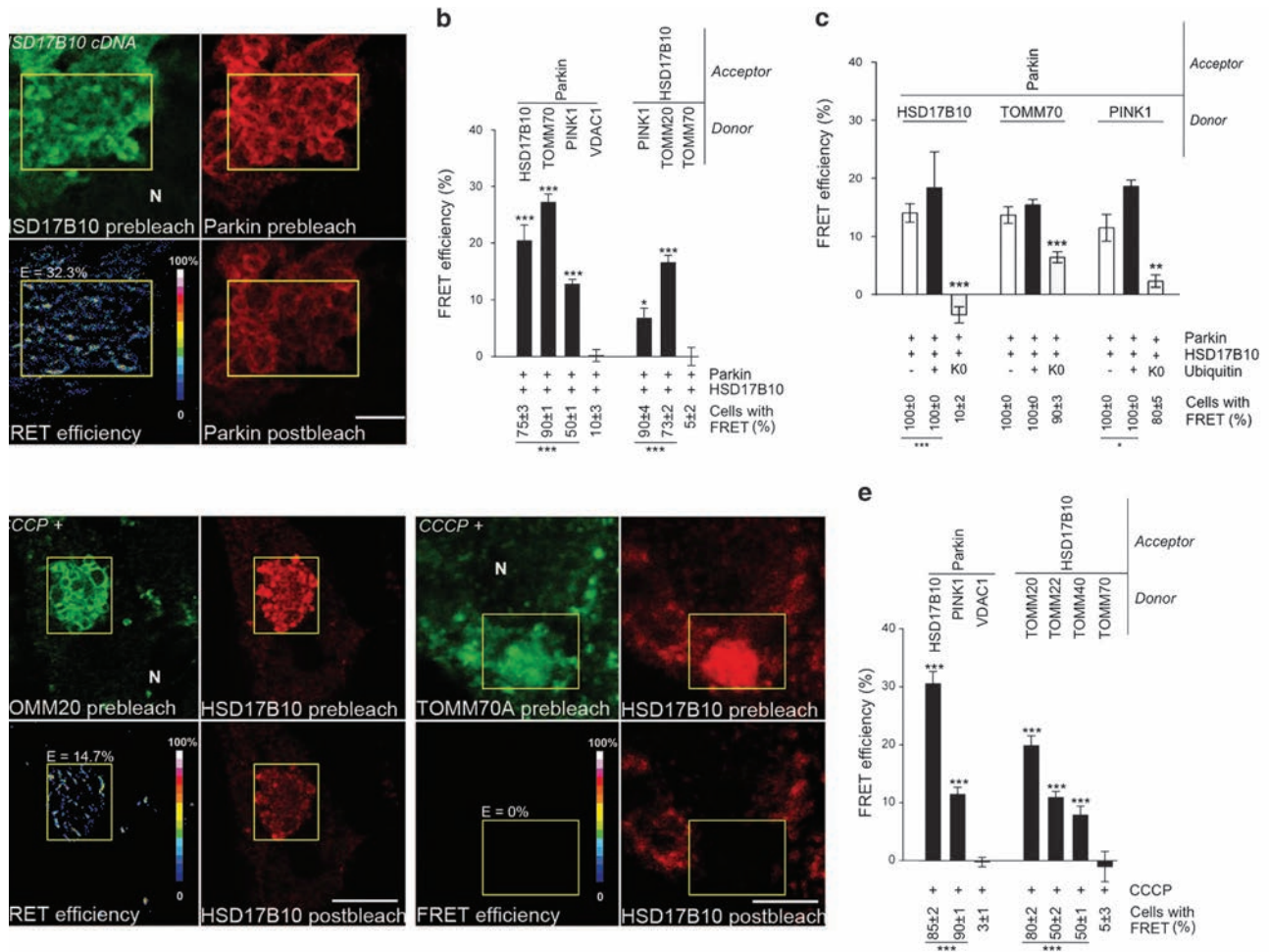


Figure 4 Parkin interacts with HSD17B10 and PINK1 at the TOM machinery. (a) Representative FRET images for the indicated donor (green)–acceptor (red) pairs in COS7 cells overproducing Parkin and HSD17B10. Pseudocolor scale: pixel-by-pixel FRET efficiencies reflecting the increase in donor fluorescence after photobleaching of the acceptor. (b, c) Quantitative FRET analysis and percentage of cells displaying FRET for all donor–acceptor pairs analyzed in the indicated conditions. $n = 10$ –20 cells from one experiment representative of three (b) or two (c) carried out. (d, e) Representative FRET images (d) and quantitative FRET analysis for the indicated donor/acceptor pairs (e) in HEK293T cells treated with CCCP for 6 h. $n = 10$ –20 cells from one experiment representative of three carried out. E: Mean FRET efficiency within the region of interest (yellow, ROI). N: nucleus. Scale bar: 10 μ m. Results are expressed as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus VDAC1/Parkin for donor/Parkin pairs and TOMM70/HSD17B10 for donor/HSD17B10 pairs in (b, e), or versus ‘– Ubiquitin’ and ‘+ Ubiquitin’ in (c)

interactions concerned exclusively endogenous proteins in HEK293T cells, or exogenous Parkin and endogenous proteins in PC12-*tet-off*-Parkin cells differentiated into neurons (Figures 4d and e; Supplementary Figure S5a).²³ Several PD-causing *PARK2* mutations abolished or reduced FRET between endogenous HSD17B10 and Parkin, consistent with weakened protein–protein interactions or altered protein configurations within the complex (Supplementary Figure S5b).

We then investigated the role of HSD17B10 in the degradation of dysfunctional mitochondria by Parkin. Parkin was recruited to mitochondria in cells lacking HSD17B10, so HSD17B10 was not required for this step (Figure 5a). Moreover, Parkin-dependent mitophagy occurred and was even enhanced following HSD17B10 depletion, resulting in a larger proportion of cells lacking the OMM marker VDAC1 soon after CCCP treatment, or lacking the matrix marker PMPCB at later time points than in control cells (Figures 5b and c). Conversely, HSD17B10 overproduction decreased mitochondrial clearance, as illustrated by the significantly smaller proportion of

cells lacking mitochondrial markers after CCCP treatment (Figure 5d). Consistent with the lack of recruitment of autophagy markers (Supplementary Figure S3), no mitochondrial clearance was observed in cells overproducing Parkin and HSD17B10 in the absence of CCCP.

HSD17B10 promotes mitochondrial elongation, protecting against mitochondrial damage following $\Delta\Psi$ collapse.

HSD17B10 overproduction was associated with a major change in mitochondrial morphology, with mitochondria appearing as long filaments extending across the cytoplasm (Figure 6a). We analyzed the morphology of the mitochondrial network by measuring two parameters widely used for this purpose: aspect ratio, providing an indication of mitochondrial length, and form factor, a combined evaluation of the length and degree of branching of the network.⁴⁴ HSD17B10 overproduction led to a large increase in aspect ratio and a moderate decrease in form factor (Figure 6b). Conversely, HSD17B10 silencing resulted in mitochondrial fragmentation,

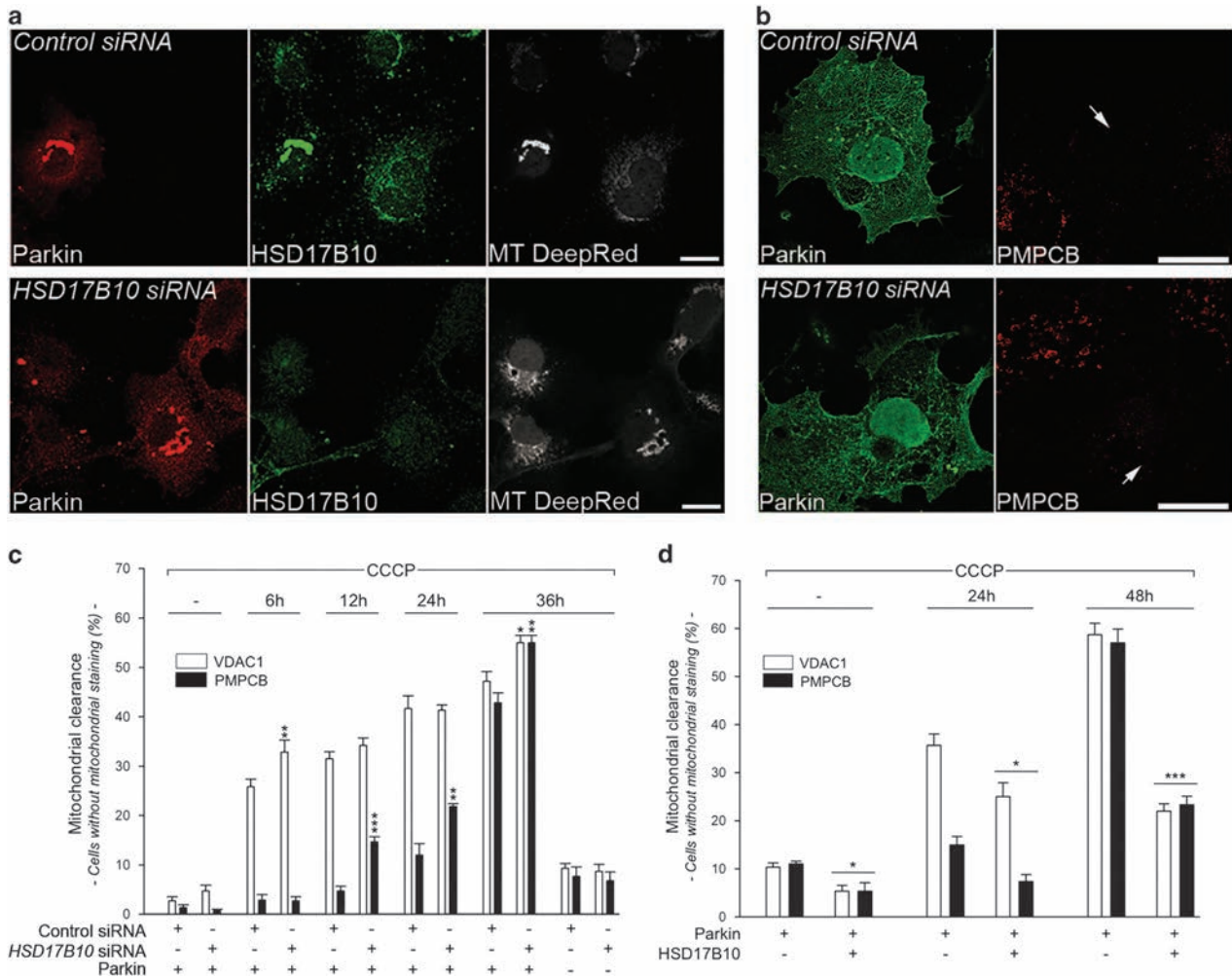


Figure 5 HSD17B10 mitigates Parkin-dependent mitophagy. (a) Representative immunocytochemical staining illustrating the mitochondrial recruitment of Parkin triggered by CCCP (6 h) in COS7 cells with and without *HSD17B10* silencing. Mitochondria were visualized by staining with MitoTracker DeepRed and for HSD17B10. (b) Representative immunofluorescence showing that mitochondrial loss triggered by CCCP (36 h) occurs in COS7 cells overproducing Parkin with and without the silencing of *HSD17B10*. Mitochondria were stained with anti-PMPCB antibodies. Scale bar: 10 μ m. (c, d) Percentage of cells devoid of the OMM marker VDAC1 or the matrix marker PMPCB at various time points after the addition of CCCP to the culture medium, in the indicated transfection conditions. Results are expressed as means \pm S.E.M. $n = 3$ independent experiments, with 180 cells scored per condition in each experiment (c) or $n = 3$ independent wells from one experiment representative of five carried out, with 90 cells scored from each well (d). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus the 'Control siRNA' (c) or versus the 'Parkin only' condition (d) at each time point

as indicated by a significant decrease in both parameters (Figures 6a and b).

Mitochondrial morphology is regulated by fusion and fission processes mediated by conserved dynamin-related GTPases:⁴⁵ optic atrophy 1 (Opa1) and mitofusins (Mfn1/2), involved in fusion of the inner and outer MMs; and dynamin-related protein 1 (Drp1), which promotes mitochondrial fission. Defective mitochondria are isolated from the healthy network by the recruitment of Drp1 from the cytosol, triggering mitochondrial fragmentation and efficient clearance.^{13,46} Using FRET microscopy, we showed that Drp1 was recruited to the proximity of PINK1 following mitochondrial depolarization.⁴⁷ The changes in mitochondrial morphology observed when HSD17B10 levels were modulated were not associated with changes to steady-state levels of Opa1, Mfn2 and Drp1 (Figures 6c and d). However, lower levels of FRET between PINK1 and Drp1 were observed in cells overproducing HSD17B10, indicating interference with Drp1

recruitment to or assembly on depolarized mitochondria (Figure 6e; Supplementary Figure S6).

Mitochondrial elongation is an adaptive prosurvival mechanism associated with a better bioenergetic response to stress.^{48–50} In starved cells, it spares mitochondria from degradation by autophagy.^{49,50} Analysis of the mean TMRM fluorescence intensity of mitochondria revealed consistently higher signals in cells overproducing HSD17B10 and a later, less severe decrease following CCCP treatment, consistent with better $\Delta\Psi$ m preservation (Figure 7a; Supplementary Figure S2e). HSD17B10 may, therefore, protect mitochondria by preserving a hyperfused network, resulting in lower levels of mitophagy, an indirect indicator of mitochondrial health. We explored this possibility by studying the effect of Drp1 on HSD17B10-mediated hyperfusion and sparing from mitophagy. We overproduced Drp1 or two Drp1 variants carrying amino-acid substitutions affecting serine 637, which is involved in regulating the subcellular distribution of the protein:⁵¹

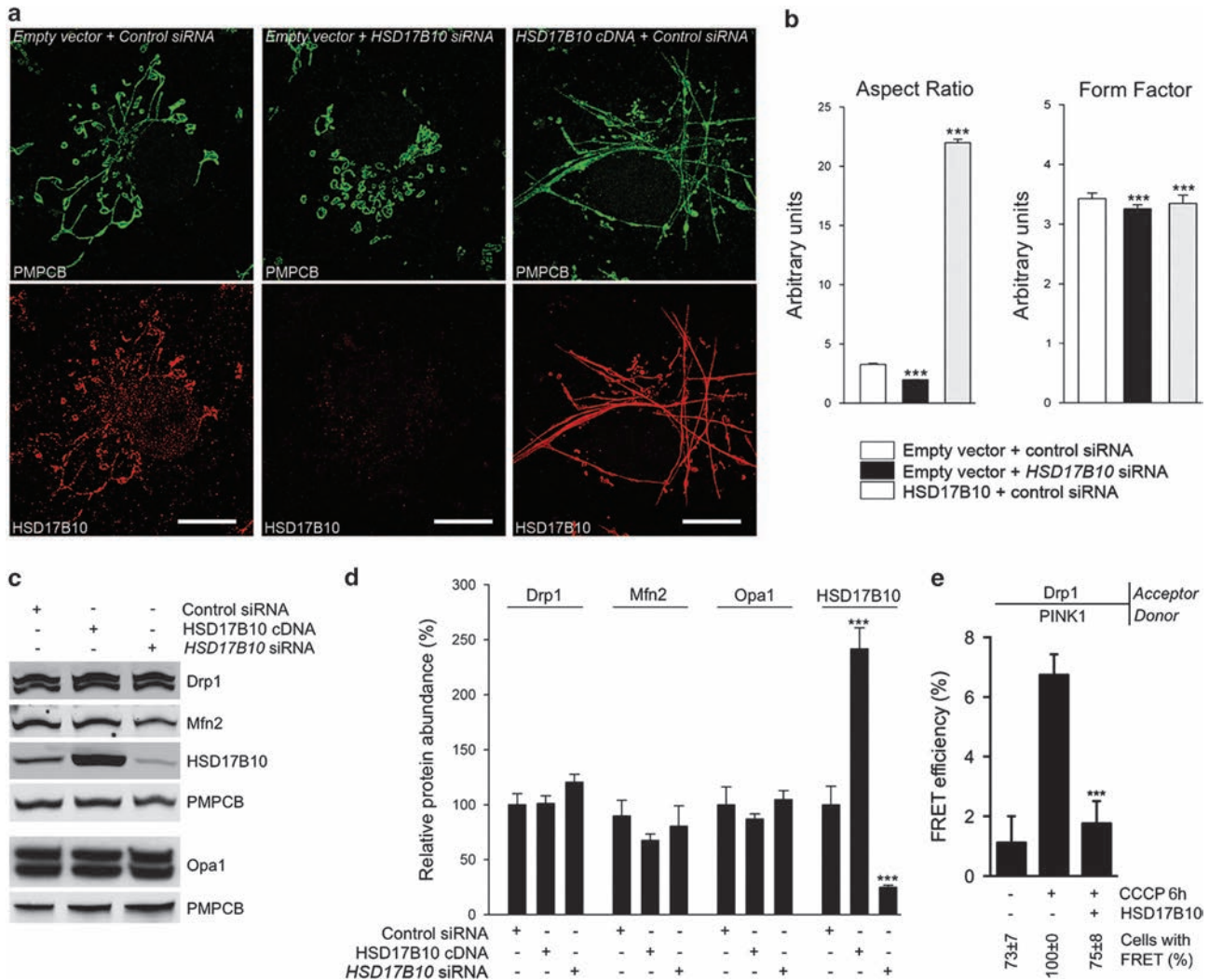


Figure 6 HSD17B10 promotes mitochondrial elongation. (a) Representative immunocytochemical staining illustrating mitochondrial networks in COS7 cells transfected with siRNAs targeting the *HSD17B10* gene or overproducing the protein. Mitochondria were visualized with anti-PMPCB and anti-*HSD17B10* antibodies. Scale bar: 10 μ m. (b) Quantitative confocal analysis of aspect ratio (length) and form factor (length and branching) of mitochondria in COS7 cells transfected as indicated. $n=30$ cells from three independent experiments. (c, d) Western blot analysis (c) and corresponding quantification (d) illustrating the effect of *HSD17B10* downregulation or overproduction on the abundance of mitochondrial shaping proteins in COS7 cells. $n=3$ independent experiments. (e) Quantitative FRET analysis illustrating the effect of *HSD17B10* overproduction on the molecular proximity between PINK1 and Drp1. $n=15-20$ cells from one experiment representative of three carried out. Results are expressed as means \pm S.E.M. *** $P < 0.001$ versus 'Empty vector+control siRNA' in (b); 'control siRNA' in (d); and '- *HSD17B10*+CCCP' in (e)

Drp1 S637A, which mimics the calcineurin-dependent dephosphorylation of this residue, leading to association of the protein with mitochondria; and Drp1 S637D, which mimics phosphorylation of the residue by protein kinase A, sequestering the protein in the cytosol.⁵¹ Drp1 S637A and, to a lesser extent, Drp1, significantly reduced mitochondrial hyperfusion and decreased the ability of *HSD17B10* to mitigate Parkin-dependent mitophagy in cells treated with CCCP, whereas Drp1 S637D had no effect (Figures 7b–e).

The mitochondrion-protecting function of *HSD17B10* requires mitochondrial elongation and not the enzymatic activity of the protein. The clinical symptoms of patients with *HSD17B10* mutations are not correlated with the activity of the encoded enzyme.^{24,26} Moreover, the *HSD17B10*-dependent preservation of mitochondrial structural and

functional integrity is independent of this activity, suggesting that another, non-enzymatic function of *HSD17B10* is required.²⁶ We explored the mechanisms by which *HSD17B10* preserves mitochondrial function, by investigating the effects of three amino-acid substitutions in *HSD17B10* with different impacts on catalytic activity (D86G, Q165H, R130C).²⁶ The three protein variants were, as expected, located in the mitochondria, as indicated by the corresponding Mander's coefficients (Figures 8a and c); like the normal protein, they were found in the mitochondrial matrix, sometimes associated with the inner MM (Figure 8d). However, the Q165H and R130C variants, which had no enzymatic activity and a residual activity of 60%, respectively, were unable to promote mitochondrial elongation and to mitigate Parkin-dependent mitochondrial clearance. By contrast, the D86G variant (residual activity of 30%) behaved like the normal

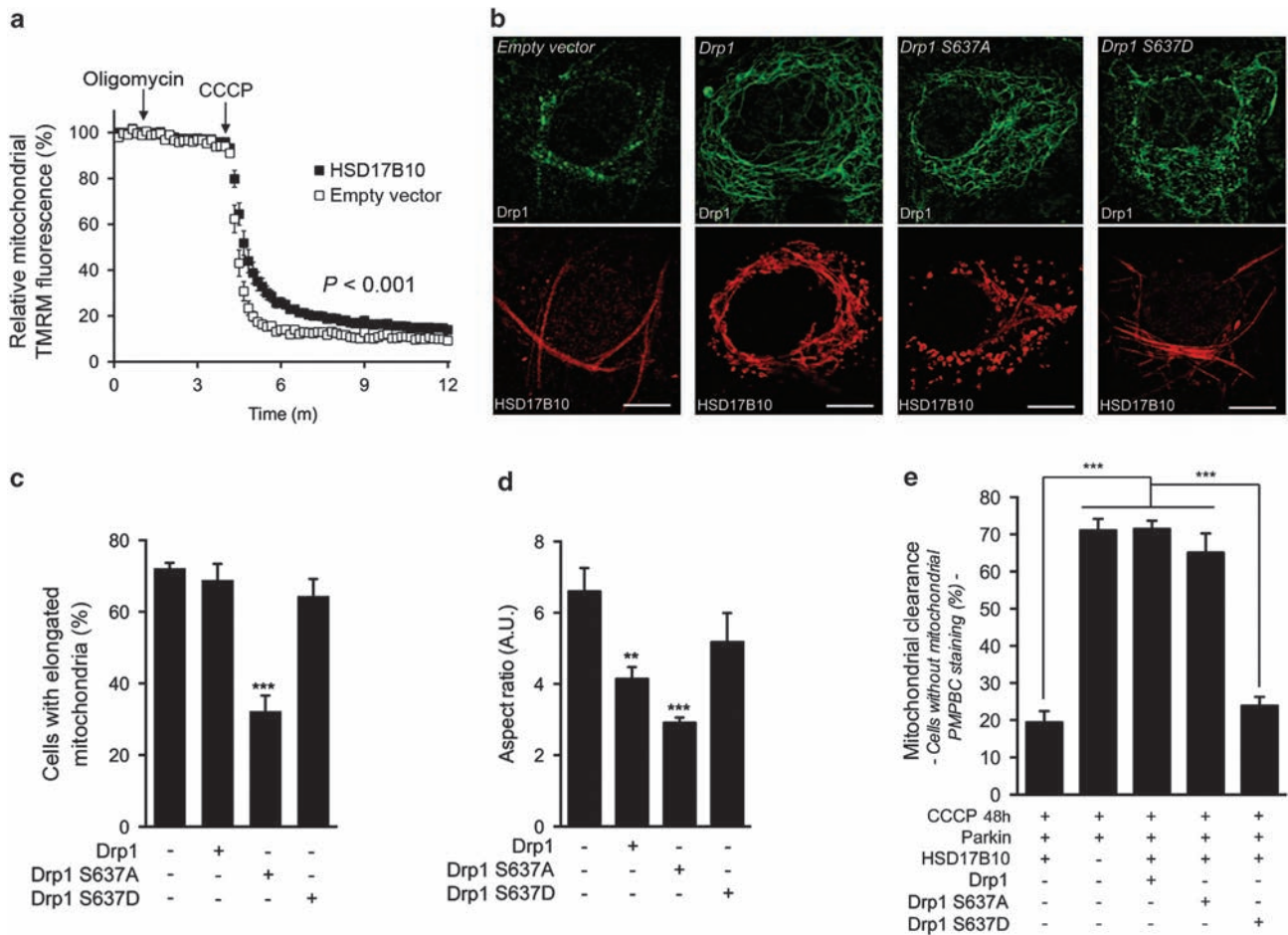


Figure 7 HSD17B10-mediated mitochondrial hyperfusion protects mitochondria against CCCP, sparing them from Parkin-dependent clearance. (a) Analysis of the relative TMRM fluorescence of mitochondria in COS7 cells transfected with a control plasmid or a plasmid encoding HSD17B10, illustrating the HSD17B10-mediated attenuation of the decrease in $\Delta\Psi_m$ triggered by CCCP. $n=20-30$ cells from one experiment representative of three carried out. (b–d) Representative immunofluorescence staining of COS7 cells, illustrating the effect of Drp1 variants on the ability of HSD17B10 to promote mitochondrial elongation (b), and quantification of these effects by evaluations of the proportion of cells with elongated mitochondria ($n=200-300$ cells from three independent experiments) (c) and the aspect ratio of mitochondria ($n=20$ cells from one experiment representative of three carried out) (d). Scale bar: $10\ \mu\text{m}$. (e) Quantification of Parkin-dependent mitophagy by analysis of the loss of the matrix marker PMPCB triggered by CCCP, in the indicated transfection conditions. $n=100-200$ cells from two independent experiments carried out. Results are expressed as means \pm S.E.M. $**P<0.01$, $***P<0.001$ versus ‘– Drp1’ in (c, d)

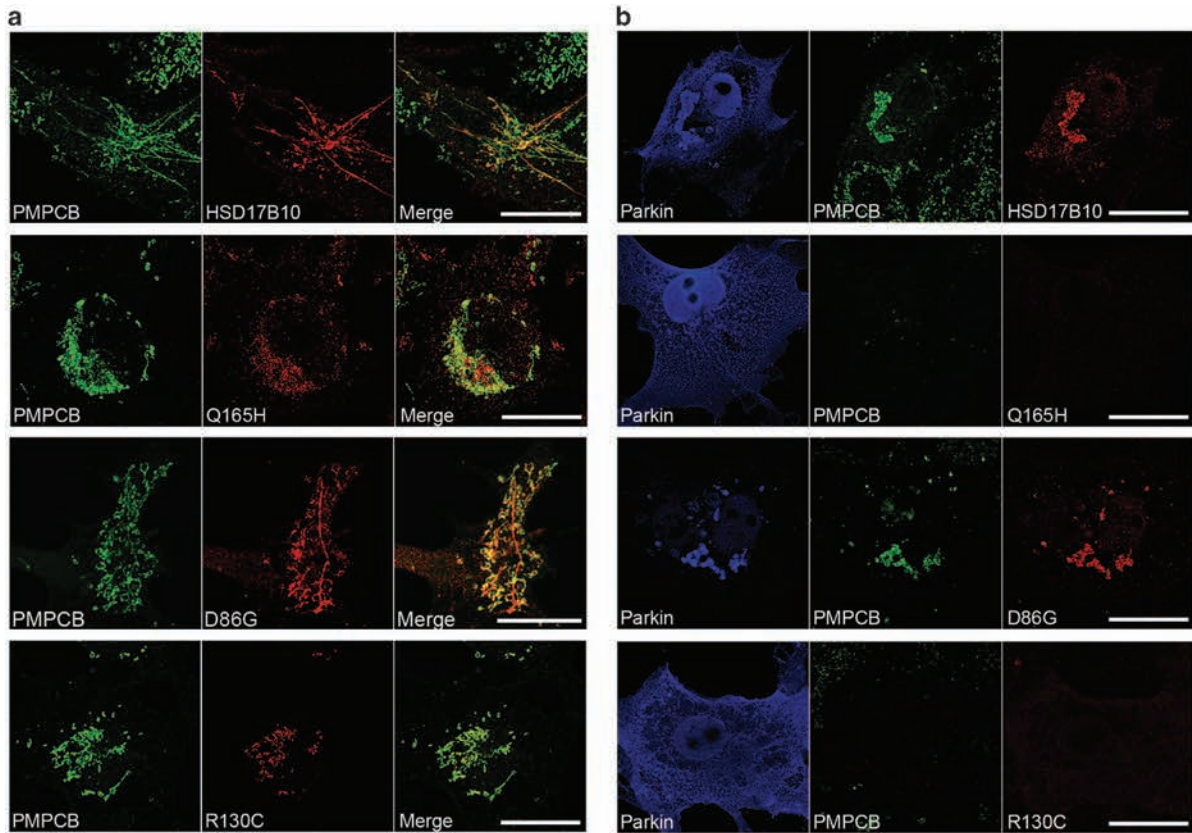
protein (Figures 8a and c). These results suggest that the mitochondrion-protecting function of HSD17B10 is directly correlated with the ability of this protein to promote mitochondrial elongation, and independent of its catalytic activity.

Discussion

We identified the multifunctional mitochondrial matrix enzyme HSD17B10 as a new Parkin substrate. Using affinity purification-mass spectrometry to identify the repertoire of Parkin substrates in response to mitochondrial depolarization, Sarraf *et al.*¹⁸ also identified HSD17B10 as a protein directly interacting with Parkin. Contrary to reports for other mitochondrial proteins, this interaction was not amplified by CCCP treatment, suggesting that its occurrence is not related to the initiation of mitophagy. Instead, Parkin seems to maintain appropriate levels of HSD17B10 in the mitochondria by promoting the mitochondrial import of this protein: (i) the

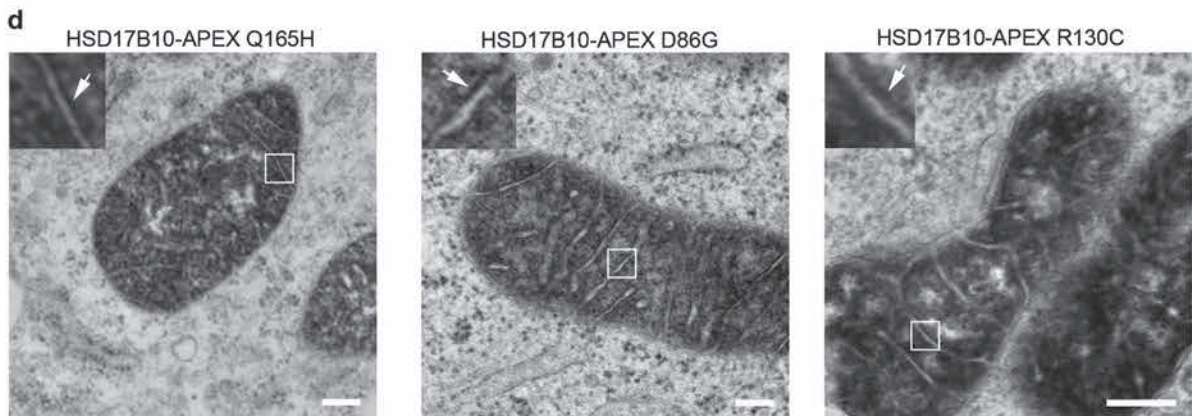
abundance of endogenous HSD17B10 was halved in mitochondrion-enriched fractions from Parkin-deficient mice; (ii) the mitochondrial targeting of an exogenous HSD17B10 protein was significantly reduced by *PARK2* or *PINK1* down-regulation, whereas it was enhanced by Parkin overproduction in various cell models; (iii) Parkin and HSD17B10 associated with the TOM machinery, close to PINK1, on functional organelles that did not undergo mitophagy; (iv) interaction with the TOM complex was detected under conditions associated with PINK1 accumulation on the OMM (HSD17B10 overproduction or CCCP treatment), consistent with unmasking due to the mitochondrial import mechanism being overwhelmed. Whether other conditions of relevance for neurodegeneration in PD would also unmask this quality control function of Parkin – e.g. mitochondrial complex I inhibition, which has also been shown to trigger Parkin recruitment to mitochondria,⁵² – remains to be investigated.

The precise mechanisms by which Parkin facilitates the intramitochondrial translocation of HSD17B10 remain unclear,



c

HSD17B10 variant	normal	Q165H	D86G	R130C
Residual catalytic activity (⁴⁰)	100%	0%	30%	60%
Colocalization with mitochondria (Mander's coefficient)	0.92 ± 0.02	0.87 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.80 ± 0.05
Elongated mitochondria	yes	no	yes	no
Protection against mitochondrial dysfunction: Cells without mitochondria after CCCP treatment (%)	yes 20 ± 3.5	no 58 ± 3	yes 15 ± 5	no 56 ± 3



but our results suggest that the protein is ubiquitylated at the OMM before import. The cytosolic degradation, by the ubiquitin-proteasome system, of proteins targeted to the mitochondrial intermembrane space regulates the biogenesis of these proteins.⁵³ Our data are not consistent with a role for the ubiquitin-proteasome system in regulating HSD17B10 levels in mitochondria, instead suggesting that modification by ubiquitin chains that are not recognized by the proteasome on the OMM upregulates HSD17B10 biogenesis. It remains unclear whether HSD17B10 is imported in a ubiquitylated state by the TOM complex.

Ubiquitin-dependent regulation of the TOM-dependent import of HSD17B10 by Parkin, possibly in cooperation with PINK1, may ensure the correct maintenance of HSD17B10 homeostasis in conditions of low mitochondrial import efficiency. The impairment of this regulatory loop may have detrimental consequences, as HSD17B10 is essential for mitochondrial physiology: the *in vivo* depletion of *HSD17B10* in *Xenopus* and mice leads to ultrastructural and functional abnormalities of the mitochondria, and constitutive knockout of the gene results in early embryonic lethality in mice.²⁶ Conversely, mice transgenic for human *HSD17B10* are protected against MPTP-mediated dopaminergic neurodegeneration.³¹ HSD17B10 levels are low in post-mortem ventral midbrain samples from patients with sporadic PD,³¹ and we show here that they also tend to be low in *caudate* and *putamen* samples from PD patients with *PARK2* mutations.

HSD17B10 transcripts are abundant in various nuclei of the basal ganglia and in regions of the human brain enriched in dopaminergic neurons.⁵⁴ These transcripts are more abundant in the *substantia nigra* than in the less vulnerable ventral tegmental area (Supplementary Figure S7). *HSD17B10* expression levels are particularly high in the *locus coeruleus* and in the dorsal motor nucleus of the *vagus* nerve, which are also affected by neurodegeneration in PD. HSD17B10 depletion beyond a certain threshold may therefore contribute to neuronal vulnerability in PD. Consistent with this possibility, Tieu *et al.*³¹ showed that the period after MPTP intoxication in mice during which the apoptotic response was strongest was accompanied by a significant, but reversible decrease in HSD17B10 abundance.

Of note, HSD17B10 levels are increased in the brains of individuals with Alzheimer's disease, indicating that maintenance of HSD17B10 homeostasis is crucial to cell physiology.^{25,29} The mechanisms by which HSD17B10 contributes to amyloid β -mediated neurotoxicity are poorly understood. However, it is not surprising that modest alterations of the levels or activity of this multifunctional enzyme can contribute to neurodegeneration in different pathological contexts.²⁵

What molecular mechanisms underlie the mitochondrion-protecting function of HSD17B10? We provide strong

evidence for a key role of mitochondrial elongation. HSD17B10 may promote this process, possibly by interfering with Drp1 recruitment to mitochondria. This morphological change has been shown to optimize ATP production under critical circumstances, but the underlying mechanisms remain unclear.^{48–50} Tieu *et al.*³¹ reported higher levels of mitochondrial respiration and ATP production in brain mitochondria from HSD17B10-transgenic mice than in those from wild-type mice, following the partial inhibition of mitochondrial complex I. This effect was not associated with changes to the enzymatic activities of the respiratory chain complexes, but was accompanied by a redistribution of HSD17B10 from the mitochondrial matrix to the inner MM. The authors suggested that HSD17B10 might associate with mitochondrial complex I under such conditions. The submitochondrial localization of the protein reported here is consistent with HSD17B10 having functions both in the mitochondrial matrix and in association with the inner MM. HSD17B10 may also participate in the activation of ATP synthase, which is also present in the inner MM and has been reported to be activated in elongated mitochondria resistant to autophagic degradation.⁴⁹ Finally, HSD17B10 may protect mitochondria through its role as a component of the mitochondrial RNase P complex, which promotes the processing of mitochondrial tRNAs through mechanisms independent of the catalytic activity of HSD17B10 and NADH binding.^{28,55} The link between these functions and the mitochondrial elongation promoted by HSD17B10 remains unclear. Interestingly, a recent study reported identification of a new mitophagy-independent pathway linking Parkin function to linear ubiquitylation of the NF- κ B modulator NEMO, upregulation of Opa1 and protection against stress.⁵⁶ Although modulation of HSD17B10 expression did not modify Opa1 levels in our study, it will be important to evaluate whether HSD17B10 has a role in this pathway.

In summary, this work suggests that the maintenance of appropriate HSD17B10 levels in the mitochondria may be a novel mitochondrial quality control mechanism regulated by Parkin. The loss of this protective function may, together with the impaired degradation of dysfunctional mitochondria, contribute to neuronal dysfunction in autosomal recessive PD. Further studies are required to dissect the precise mechanisms by which Parkin preserves mitochondrial HSD17B10 levels, and to determine the extent to which they involve functional cooperation with PINK1 and the direct regulation of mitochondrial import through the TOM machinery.

Materials and Methods

Mammalian expression vectors, cell culture and transfection.

The human HSD17B10 cDNA (UniProt Q99714) was inserted into pcDNA3; the HSD17B10 variants D86G, R130C and Q165H, kindly provided by J Zschocke, were inserted into pSMART. The other vectors used were pcDNA3 (Invitrogen,

Figure 8 Mitochondrial elongation rather than catalytic activity determines the ability of HSD17B10 to spare mitochondria from the degradation triggered by CCCP. (a–c) Representative immunofluorescence staining of COS7 cells, illustrating the degree to which HSD17B10 variants with various levels of residual activity can promote mitochondrial elongation (a), and protect against CCCP-induced mitochondrial dysfunction (b), as illustrated by the qualitative and quantitative estimates provided in the table (c). Mitochondria were visualized with HSD17B10 and PMPCB. Mander's coefficients indicate the colocalization of HSD17B10 and PMPCB staining ($n = 30$ cells from three independent experiments). The percentages of COS7 cells coproducing Parkin and the indicated HSD17B10 variants displaying a loss of PMPCB 36 h after the addition of CCCP to the culture medium are represented as means \pm S.E.M. ($n = 3$ independent experiments, with 60 cells scored per condition in each experiment). (d) Representative electron micrographs showing the submitochondrial localization of the HSD17B10 variants. Contrast was generated by treatment with diaminebenzidine. The arrow in the higher magnification of the framed region shows the association of HSD17B10 with the inner MM. Scale bar: 10 μ m in (a, b) and 200 nm in (d)

Life Technologies, Saint-Aubin, France) encoding human HA- or FLAG-tagged Parkin, Parkin variants, p38/JTV-1/AIMP⁵⁷ HA-, Myc- or V5-tagged HSD17B10, or FLAG-tagged DLST (provided by Z Ronai); pTrc-His (Invitrogen) encoding HSD17B10; pET (Clontech, Takara Bio Europe, Saint-Germain en-Laye, France) encoding HA-tagged ubiquitin; pDsRed-LC3 (provided by G Kroemer); pCB6-HA-mitoGFP (COX VIII MTS) and pCB6-Myc-Drp1 (provided by M Rojo); pCB6-Myc-Drp1 S637D/S637A, produced by site-directed mutagenesis from pCB6-Myc-Drp1; pCI (Promega, Charbonnières, France) encoding C-terminally APEX (pea L-ascorbate peroxidase K14D, W41F, E112K mutant)⁵⁸-tagged HSD17B10 and HSD17B10 variants D86G, Q165H and R130C; pEF-HA-UbiK0/Ubi (provided by Y Yarden). The resulting cDNAs were then inserted into the pCI expression vector (Promega) via the *NheI* and *NotI* restriction sites. The sequences of three plasmid constructs were checked with an ABI3730 XL. The siRNAs used were validated HSD17B10-specific siRNAs and AllStars negative control siRNA (Qiagen, Courtabouef, France; 20 nM), *PINK1*- and *PARK2*-specific stealth siRNAs (Invitrogen, 20 nM). PC12-*tet-off*-Parkin, HEK293T and COS7 cells were grown as previously described.^{22,23} Cells were transfected in the presence of DMRIE-C (Invitrogen; COS7, PC12) or in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen; COS7, HEK293T) for siRNA. Cells were incubated with 10 μ M CCCP (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for the indicated time points; 15 μ g/ml nocodazole (Calbiochem, Millipore, Guyancourt, France) or 400 nM cycloheximide (Sigma-Aldrich) for 16 h; 1 μ M epoxomicin (Sigma-Aldrich) for 16 h; 50 nM doxycycline (Dox; Sigma-Aldrich); 5 μ g/ml oligomycin (Sigma-Aldrich).

Quantitative real-time RT-PCR. We checked the efficacy of the siRNA-mediated silencing of endogenous *PARK2* in HEK293T cells, by isolating total RNA from cells transfected with control or *PARK2* siRNA, using the RNeasy plus Mini Kit (Qiagen). RNA from each sample (1 μ g) was reverse-transcribed to generate cDNA. Real-time PCR was performed with the LightCycler 480 System (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and the LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Life Science, Meylan, France). Results were analyzed with LightCycler 480 sw 1.5 quantification software. We used the actin gene for normalization. The primers used for *PARK2* were as follows: forward 1, 5'-acacaaagcatctccagctca-3'; reverse 1, 5'-ttctccacggtctctgcac-3'; forward 2, 5'-cgcaacaaatagctcgaaac-3'; reverse 2, 5'-gagggtctgtaacaaactg-3'.

GST pulldown, subcellular fractionation and western blot analyses. GST pulldown assays were carried out as previously described.⁵⁷ Cells were lysed in 20 mM Hepes, 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, with phosphatase (0.2 mM Na₃VO₄, 1 mg/ml NaF, 5.4 mg/ml β -glycerophosphate) and protease inhibitors (Complete Cocktail, Roche), pH 7.0 and the lysate was passed through a 22G needle to obtain total protein extract (COS7, HeLa cells). For ubiquitylation assays, COS7 cells were lysed 48 h after transfection, in a co-IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5% NP40, 0.2 mM Na₃VO₄, 4 mg/ml NaF, Complete protease inhibitor cocktail; Roche). Lysates were centrifuged at 4 °C for 30 min at 13 000 \times g. Supernatants were precleared by incubation with protein G Sepharose (Amersham, Dominique Dutscher, Brumath, France) for 1 h at 4 °C, and incubated with 2 μ g of monoclonal anti-myc antibodies conjugated to protein G-Sepharose beads for 2 h at 4 °C, with gentle shaking. Immunoprecipitated proteins were washed four times in the co-IP buffer and once in PBS and analyzed by western blotting with monoclonal anti-HA antibodies. Lysates were subjected to western blotting with an anti-myc or a monoclonal anti-Parkin antibody. *In vitro* ubiquitylation assays were performed as previously described.⁵⁹ Mitochondrion-enriched fractions were obtained by differential centrifugation, from cells homogenized with a Dounce homogenizer (80 manual strokes) as previously described,²² or with a mitochondrion isolation kit used according to the manufacturer's instructions (MACS, Miltenyi Biotec, Mercoeur, France; Pierce Mitochondria Isolation kit, Pierce, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Cytosolic fractions were obtained by ultracentrifugation of the supernatants obtained after isolation of the mitochondrion-enriched fractions at 186 000 \times g for 1.5 h at 4 °C. Pure mitochondrial fractions were obtained from mouse brains that had been ground, washed and homogenized with a Potter homogenizer, in 6 ml of isolation buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM Hepes, 1 mg/ml BSA; pH 7.2), and centrifuged at 1700 \times g for 10 min at 4 °C. The supernatant was layered on top of a Ficoll gradient (5 ml of 10% Ficoll and 5 ml of 7.5% Ficoll) in sucrose buffer (0.3 M sucrose, 25 mM EGTA, 5 mM Hepes) and centrifuged at 80 000 \times g for 30 min at 4 °C. Mitochondrial pellets were resuspended in isolation buffer. Human brain protein extracts from PD patients and controls were obtained from lyophilized tissue³⁷ resuspended in 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 100 mM MgCl₂, 0.1 M Na₂VO₃,

10 mM Na₄P₂O₇ \times 10 H₂O, 100 mM NaF, 1 mM EGTA, with protease inhibitors, homogenized in a Piston Pellet Eppendorf, and centrifuged at 4 °C for 5 min at 9000 \times g and for 45 min at 100 000 \times g. The mitochondrial abundance of exogenous HSD17B10 was calculated as the ratio of HSD17B10 to mitoGFP in mitochondrion-enriched fractions, divided by that in total cell fractions ($[\text{HSD17B10}/\text{mitoGFP}]_{\text{M}}/[\text{HSD17B10}/\text{mitoGFP}]_{\text{T}}$), and the mitochondrial abundance of subunits (S) of respiratory chain complexes was calculated as $[\text{S}/\text{actin}]_{\text{M}}/[\text{S}/\text{actin}]_{\text{T}}$. The mean values for the Dox - /CCCP - conditions were arbitrarily set at approximately 1. Mitochondrion-enriched fractions, obtained by differential centrifugation, were digested with 1 μ g of trypsin (Sigma-Aldrich) per mg of protein for 20 min at 37 °C. The antibodies used for western blotting are indicated in Supplementary Table 1. Proteins were visualized with fluorescent antibodies or by enhanced chemiluminescence (Pierce). Chemiluminescence/fluorescence signals were detected on a film (ECL, Amersham Hyperfilm) or captured with a KODAK Image Station 4000 MM (KODAK, Rochester, NY, USA) or Odyssey Imaging (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) system, and quantified with KODAK MI Software 4.0, ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) or Li-COR Image Studio.

Immunocytochemistry, epifluorescence, confocal and electron microscopy. Cells were fixed and stained by standard procedures. The antibodies used are indicated in Supplementary Table 2. MitoTracker (DeepRed/CMX-ROS; final concentration 500 nM) and TMRM (final concentration 10 nM) were purchased from Invitrogen and used according to the manufacturer's instructions. Mitochondrial aggregates, the translocation of p62, LC3-DsRed or Parkin, and mitophagy were quantified with a Zeiss Axioplan 2 imaging epifluorescence microscope equipped with ExploraNova FluorUp imaging software (4.2.2, Explora Nova, La Rochelle, France) and a \times 100 oil immersion objective (NA 1.40). Mitophagy and mitochondrial aggregation were assessed as the percentages of Parkin-positive or -negative cells devoid of VDAC1 and PMPCB staining (clearance), and cells with aggregates immunoreactive for Parkin and mitoGFP, DLST, p62, LC3-DsRed or HSD17B10 (aggregation). MitoTracker intensities were quantified on images of 10 cells per condition, in each of three independent experiments, with ImageJ analysis software (NIH). TMRM intensities were acquired with an inverted Zeiss Axiovert 200 videomicroscope (Zeiss, Jena, Germany) and a \times 20 oil immersion objective (Supplementary Figure S2e), or an inverted Nikon Elipse Ti microscope with a \times 20 objective (Figure 7a). We evaluated the effect of HSD17B10 overproduction on the response of $\Delta\Psi_{\text{m}}$ to CCCP (2 μ M) after addition of the complex V inhibitor oligomycin (5 μ g/ml) by acquiring images at 10 s intervals over a 12-min period. The mean mitochondrial TMRM fluorescence intensity per cell was estimated with the ImageJ software, by selecting the entire mitochondrial network of each cell. Colocalization images were generated with a Leica SP2 or an Olympus FV-1000 confocal microscope (\times 60 oil immersion objective, NA 1.35). For FRET, images of donor and acceptor fluorescence were acquired with a Leica SP2 or an Olympus FV-1000 confocal microscope (\times 60 oil immersion objective, NA 1.35). A region of interest was drawn with Leica Confocal Software (Leica) or with Olympus FV-1000 software (Olympus, Tokyo, Japan), on randomly chosen areas of acceptor fluorescence. This region of interest was then photobleached with a 543 nm helium neon laser. Donor (D) fluorescence (F) intensities (I) were quantified with ImageJ, and FRET efficiencies were determined as follows: % FRET = $(I_{\text{D}} \text{ postbleach} - I_{\text{D}} \text{ prebleach})/I_{\text{D}} \text{ postbleach} = F_{\text{D}} \text{ postbleach} > F_{\text{D}} \text{ prebleach}$. The morphology of the mitochondrial network was analyzed quantitatively with the ImageJ software, as previously described,^{44,47} after the acquisition of images with the Zeiss Axioplan 2 imaging epifluorescence microscope (\times 63 oil immersion objective; Figure 6) or the Olympus FV-1000 confocal microscope (\times 60 oil immersion objective; Figure 7). Quantitative analysis of the morphology of the mitochondrial network, visualized by PMPCB or HSD17B10 staining, was performed on 20–30 pictures of cells overproducing the proteins of interest, with the ImageJ software (NIH), as previously described.^{44,47} Standard and immunoelectron microscopy were carried out as previously described, with a JEOL 1200 EX2 electron microscope (Peabody, Peabody, MA, USA) at 80 kV (Figures 3f and g and Figure 8d).^{23,60} For the localization of HSD17B10-APEX proteins, the cells were kept at room temperature for all steps from fixation to resin infiltration, and processed as previously described.⁵⁸ They were then analyzed with a Hitachi 120 kV HT 7700 transmission electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) at 70 kV.

Statistical analyses. Two-way ANOVA and the Holm-Sidak method were used to analyze the effects of Parkin and CCCP treatment or UbiK0 overproduction on HSD17B10 abundance (Figures 2a and b); the modulation of HSD17B10 levels on the clearance of mitochondrial markers (Figure 5) or mitochondrial TMRM

fluorescence over time after CCCP treatment (Figure 7a). One-way ANOVA and the Holm-Sidak method were used to analyze the effects of HSD17B10, DLST or mitoGFP on the mitochondrial translocation of Parkin (Figure 3b); *PARK2* variants on the mitochondrial translocation of Parkin triggered by HSD17B10 (Figure 3c); ubiquitin and UbiK0 on mitochondrial aggregation (Figure 3e); donors on FRET efficiencies for a given acceptor (Figures 4 and 6e; Supplementary Figure S5a); *PARK2* mutations on FRET efficiencies (Supplementary Figure S5b); CCCP or the modulation of HSD17B10 levels on TMRM intensities (Supplementary Figure S2e); modulation of HSD17B10 levels on PINK1 levels (Supplementary Figure S2f) or relative abundance of Opa1, Mfn2 or Drp1 (Figure 6d); Drp1 or Drp1 variants on mitochondrial morphology (Figures 7c and d); HSD17B10 on Parkin-dependent mitophagy, or Drp1 or Drp1 variants on the mitophagy-mitigating effect of HSD17B10 (Figure 7e). ANOVA on ranks and Dunn's method were used to compare the effects of transfection condition or CCCP treatment on the mitochondrial recruitment of p62 or LC3-DsRed (Supplementary Figure S3); *PARK2* silencing or UbiK0 on HSD17B10 abundance (Figure 2d); modulation of HSD17B10 levels on mitochondrial network complexity (Figure 6b). Student's *t* test was used to analyze the effects of drugs on mitochondrial aggregation (Supplementary Figure S4); *PINK1* silencing on the mitochondrial translocation of Parkin (Figure 3d); Parkin deficiency on HSD17B10 abundance (Figure 1a); *PARK2* siRNA on *PARK2* mRNA levels (Supplementary Figure S1a); *PARK2* or *PINK1* silencing on HSD17B10 abundance (Supplementary Figure S1b); epoxomicin on HSD17B10 abundance in the cytosol or mitochondria (Supplementary Figure S1c).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank M Rojo and A Lombès for helpful discussions, S Jacquier for technical assistance, the *Plate-Forme d'Imagerie Cellulaire de la Pitié-Salpêtrière* (PICPS), G Kroemer Y, Z Ronai, Y Yarden, M Rojo, J Zschocke for providing vectors, and the Queen Square Brain Bank (QSBB, Institute of Neurology, London) for providing human brain tissue. This work was supported by *Institut national de la santé et de la recherche médicale, Association France Parkinson, Fondation de France* (Engt 2007 006456, Engt 2012 00034508), *Agence Nationale de la Recherche* (ANR-08-MNPS-02-01) APOPIIS (funded by the EU under the Sixth Framework Programme, Grant Agreement LSHM-CT-2003-503330), MEFOPA (funded by the EU under the 7th Framework Programme, Grant Agreement HEALTH-2009-241791), *Fondation ICM, 'Investissements d'avenir' ANR-10-IAIHU-06*. GB and MJ were supported by a fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. GB was also supported by *Fondation de France*.

Author contributions

GB and MJ designed, performed and analyzed the experiments and wrote the manuscript; ST designed, performed and analyzed the experiments; RF-M, HA-O, TSG and M-PM performed and analyzed the experiments; HT and AJL provided neuropathologically characterized human brain tissue; FC, CG and DG designed and provided APEX constructs and advice; KG and EAF performed the experiments, shared protocols and provided advice; AB jointly supervised the work and provided funding; OC supervised and coordinated the work, provided funding and wrote the manuscript.

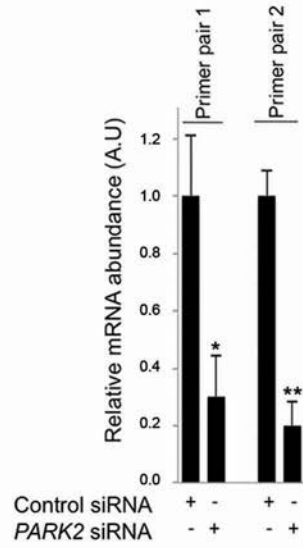
- Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 2011; **91**: 1161–1218.
- Byrd RA, Weissman AM. Compact Parkin only: insights into the structure of an autoinhibited ubiquitin ligase. *EMBO J* 2013; **32**: 2087–2089.
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH et al. *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; **441**: 1162–1166.
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; **441**: 1157–1161.
- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 14503–14508.
- Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 1638–1643.

- Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, Vogel H et al. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 7070–7075.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; **183**: 795–803.
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 119–131.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010; **189**: 211–221.
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010; **8**: e1000298.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 378–383.
- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 2010; **191**: 1367–1380.
- Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RL et al. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 1726–1737.
- Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2011; **286**: 19630–19640.
- Okatsu K, Iemura S, Koyano F, Go E, Kimura M, Natsume T et al. Mitochondrial hexokinase HK1 is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **428**: 197–202.
- Sun Y, Vashisht AA, Tchiew J, Wohlschlegel JA, Dreier L. Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* 2012; **287**: 40652–40660.
- Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP et al. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 2013; **496**: 372–376.
- McCoy MK, Kaganovich A, Rudenko IN, Ding J, Cookson MR. Hexokinase activity is required for recruitment of parkin to depolarized mitochondria. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: 145–156.
- Chen Y, Dorn GW 2nd. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 2013; **340**: 471–475.
- Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* 2012; **22**: 320–333.
- Bertolin G, Ferrando-Miguel R, Jacoupy M, Traver S, Grenier K, Greene AW et al. The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. *Autophagy* 2013; **9**: 1801–1817.
- Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome *c* release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 517–526.
- Zschocke J. HSD10 disease: clinical consequences of mutations in the HSD17B10 gene. *J Inher Metab Dis* 2012; **35**: 81–89.
- Yang SY, He XY, Isaacs C, Dobkin C, Miller D, Philipp M. Roles of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in neurodegenerative disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; **143**: 460–472.
- Rauschenberger K, Scholer K, Sass JO, Sauer S, Djuric Z, Rumig C et al. A non-enzymatic function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 is required for mitochondrial integrity and cell survival. *EMBO Mol Med* 2010; **2**: 51–62.
- Zschocke J, Ruitter JP, Brand J, Lindner M, Hoffmann GF, Wanders RJ et al. Progressive infantile neurodegeneration caused by 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency: a novel inborn error of branched-chain fatty acid and isoleucine metabolism. *Pediatr Res* 2000; **48**: 852–855.
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmann W. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 2008; **135**: 462–474.
- Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F et al. An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1997; **389**: 689–695.
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N et al. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 2004; **304**: 448–452.
- Tieu K, Perier C, Vila M, Caspersen C, Zhang HP, Teismann P et al. L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase II protects in a model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; **56**: 51–60.
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003; **278**: 43628–43635.
- Hier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2277–2291.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; **279**: 18614–18622.

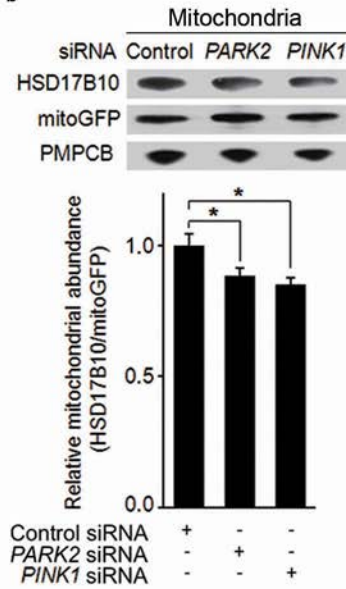
35. Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ et al. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10744–10749.
36. Perez FA, Palmiter RD. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2174–2179.
37. Periquet M, Corti O, Jacquier S, Brice A. Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* 2005; **95**: 1259–1276.
38. Damiano M, Gautier CA, Bulteau AL, Ferrando-Miguel R, Gouarne C, Paoli MG et al. Tissue- and cell-specific mitochondrial defect in Parkin-deficient mice. *PLoS One* 2014; **9**: e99898.
39. Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* 2012; **13**: 378–385.
40. Jin SM, Youle RJ. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy* 2013; **9**: 1750–1757.
41. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 2002; **115**: 1663–1674.
42. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 2009; **138**: 628–644.
43. Snapp EL, Hegde RS. Rational design and evaluation of FRET experiments to measure protein proximities in cells. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; **Chapter 17**: Unit 17 19.
44. Koopman WJ, Visch HJ, Verkaart S, van den Heuvel LW, Smeitink JA, Willems PH. Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **289**: C881–C890.
45. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 870–879.
46. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008; **27**: 433–446.
47. Buhlman L, Damiano M, Bertolin G, Ferrando-Miguel R, Lombes A, Brice A et al. Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 2012–2026.
48. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 2009; **28**: 1589–1600.
49. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 589–598.
50. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 10190–10195.
51. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 15803–15808.
52. Joselin AP, Hewitt SJ, Callaghan SM, Kim RH, Chung YH, Mak TW et al. ROS-dependent regulation of Parkin and DJ-1 localization during oxidative stress in neurons. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 4888–4903.
53. Bragoszewski P, Gornicka A, Sztolsztener ME, Chacinska A. The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 2136–2148.
54. Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 2012; **489**: 391–399.
55. Vilardo E, Nachbagauer C, Buzet A, Taschner A, Holzmann J, Rossmannith W. A subcomplex of human mitochondrial RNase P is a bifunctional methyltransferase–extensive moonlighting in mitochondrial tRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 11583–11593.
56. Muller-Rischart AK, Pilsel A, Beaudette P, Patra M, Hadian K, Funke M et al. The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Mol Cell* 2013; **49**: 908–921.
57. Hampe C, Ardilla-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 2059–2075.
58. Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE et al. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol* 2012; **30**: 1143–1148.
59. Fallon L, Belanger CM, Corera AT, Kontogiannina M, Regan-Klapisz E, Moreau F et al. A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 834–842.
60. Escobar-Khondiker M, Hollerhage M, Muriel MP, Champy P, Bach A, Depienne C et al. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci* 2007; **27**: 7827–7837.

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

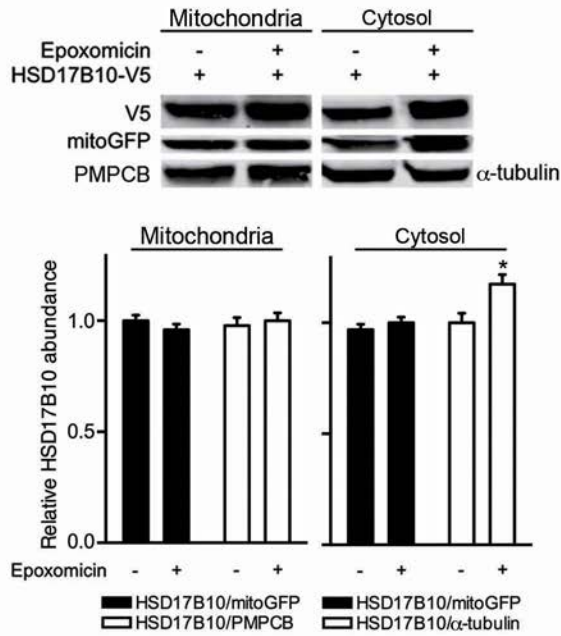
Figure S1
a



b



c



d

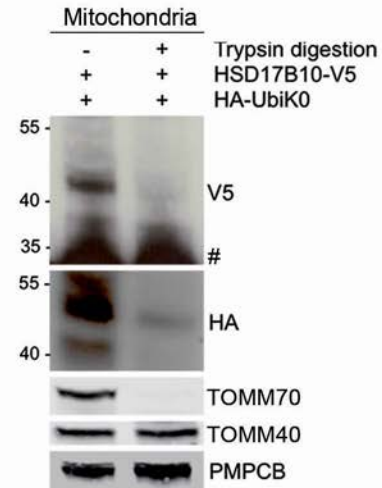


Figure S2

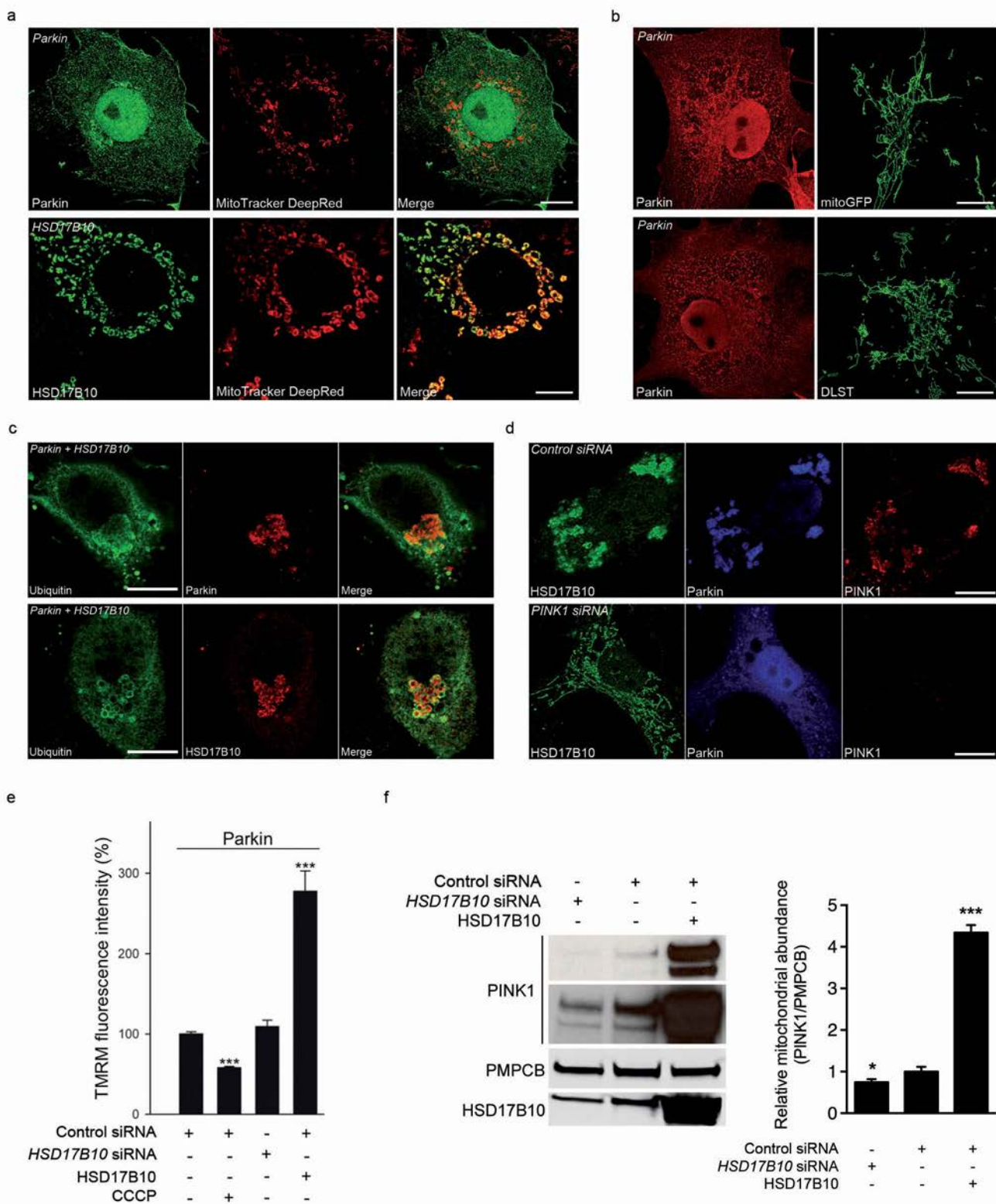
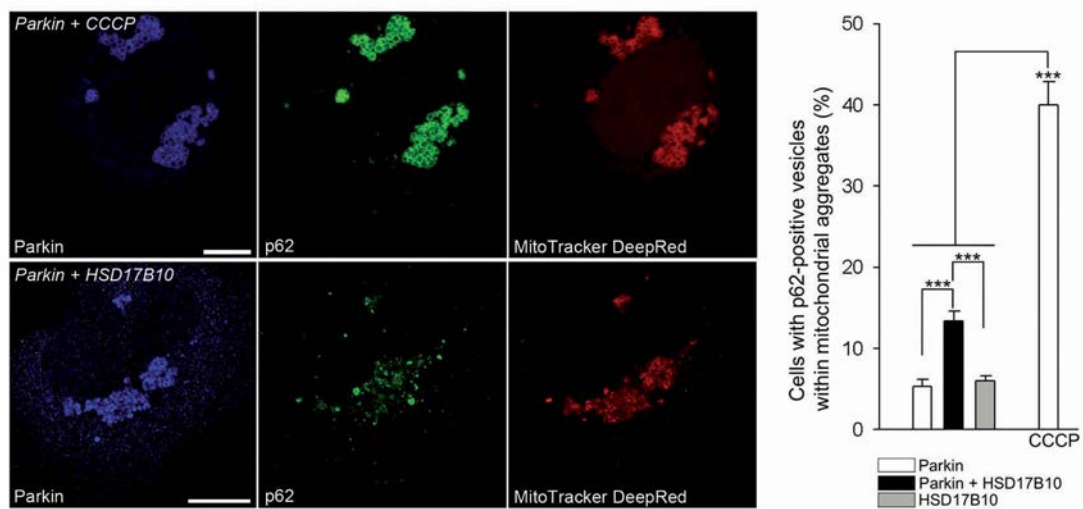


Figure S3

a



b

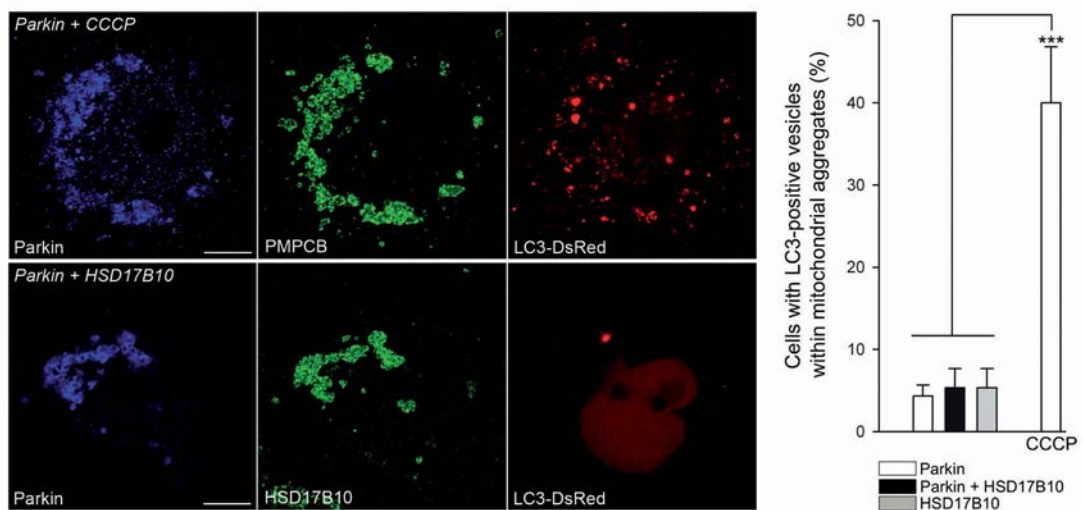


Figure S4

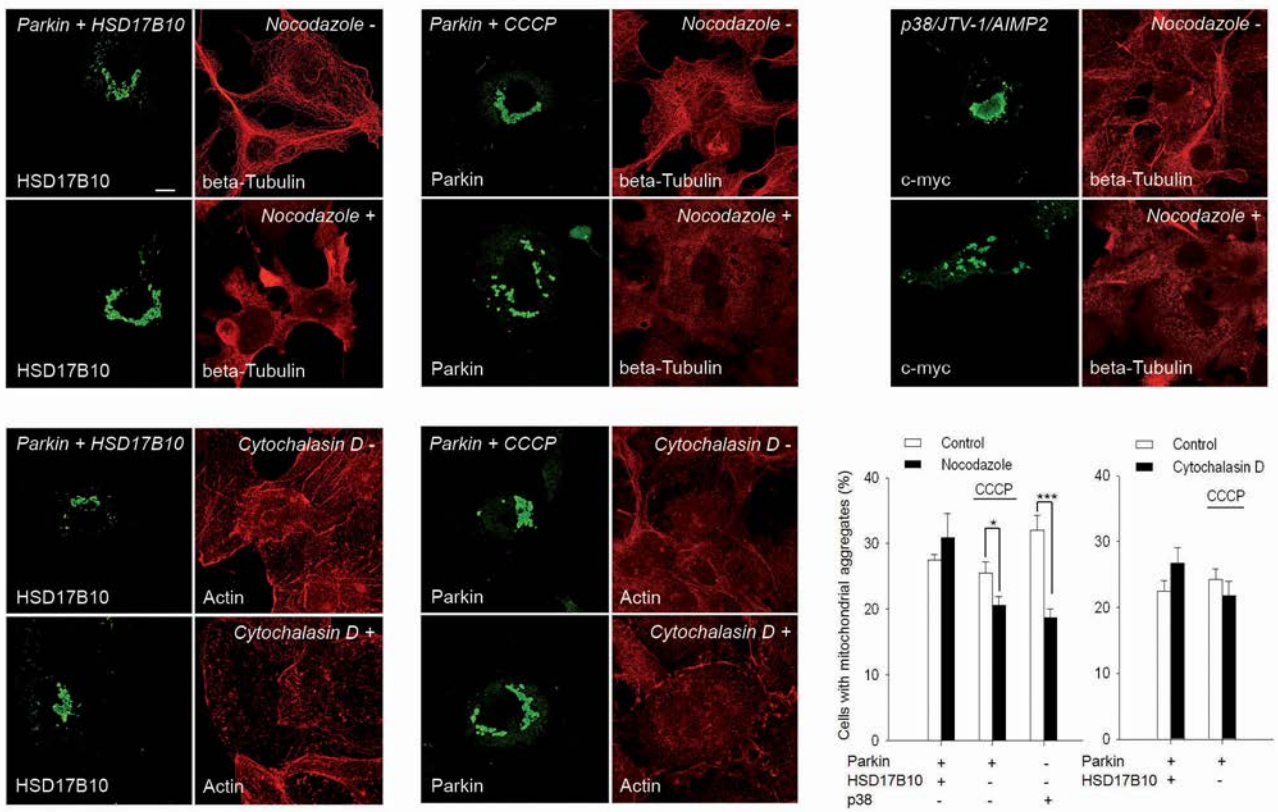
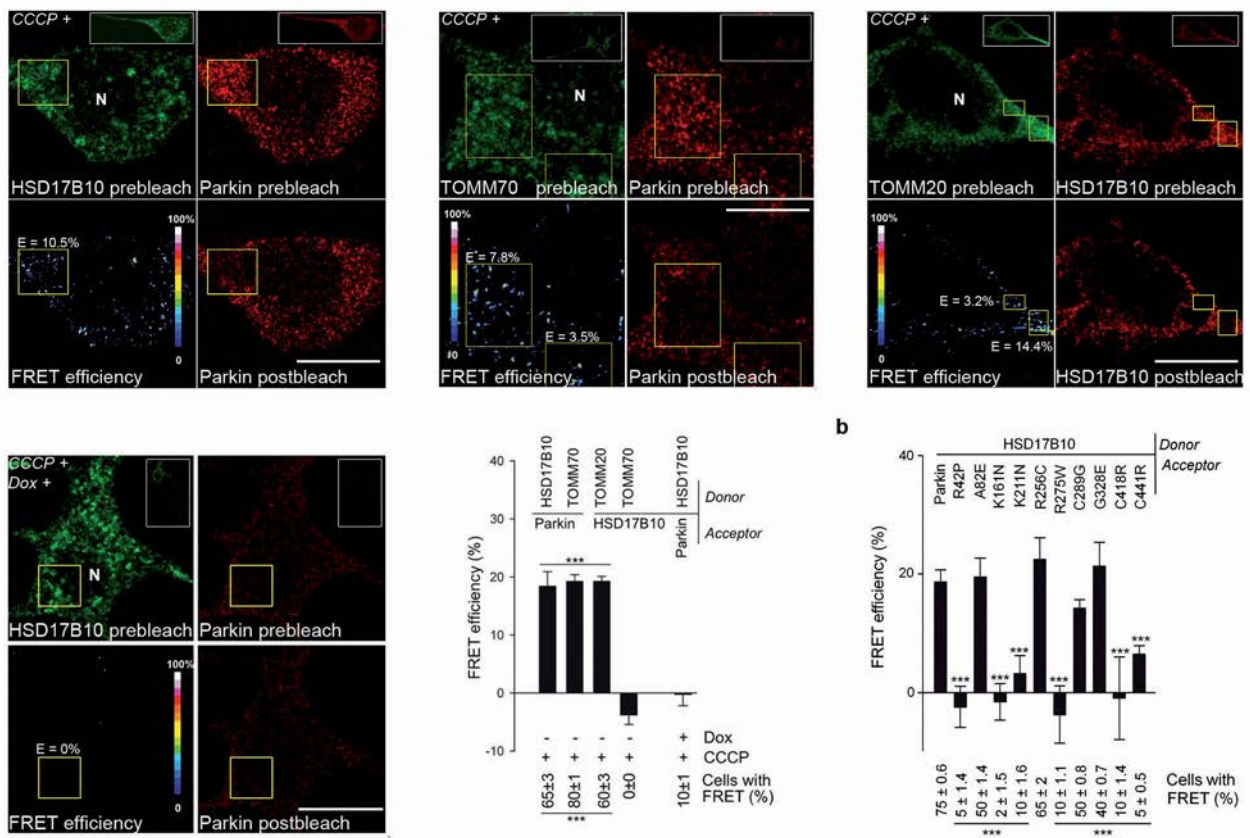


Figure S5

a



b

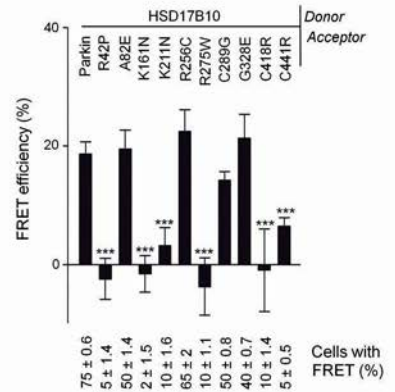


Figure S6

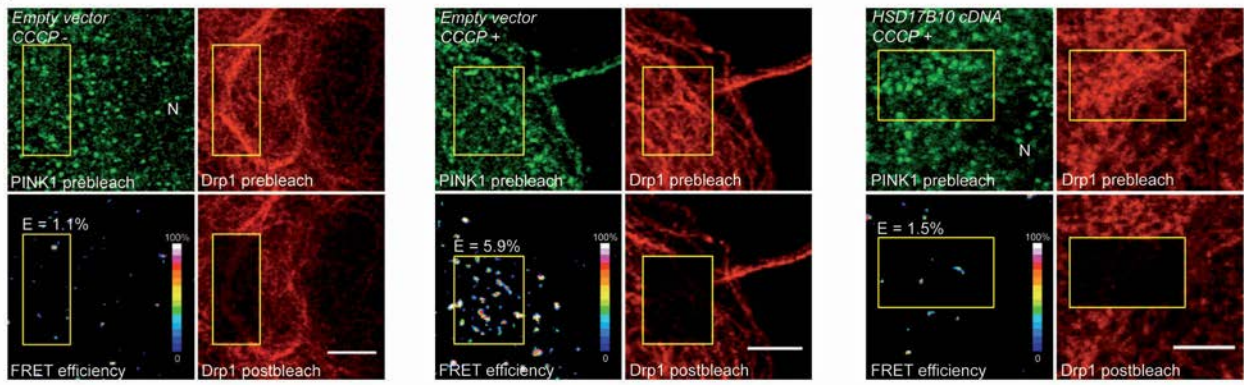
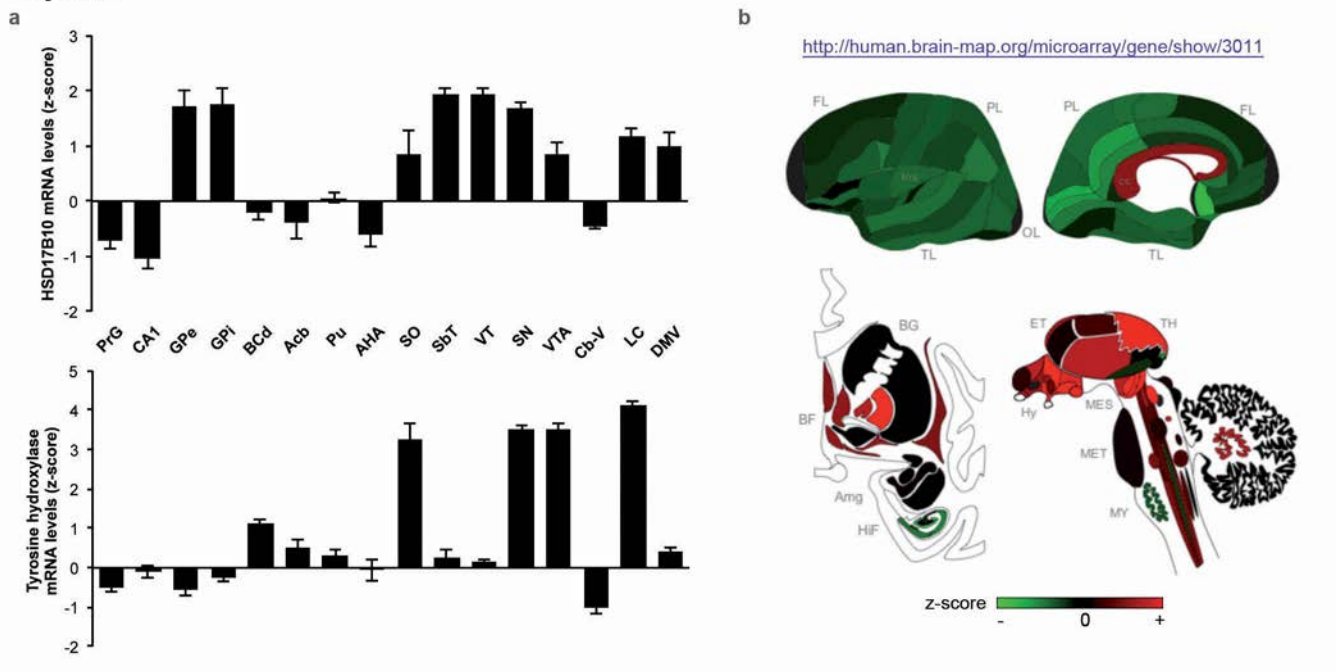


Figure S7



Supplementary Information

This section comprises:

- Supplementary figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 in .jpeg format, and the corresponding Supplementary Figure Legends.
- Supplementary Tables 1 and 2, indicating the primary and secondary antibodies used for western blotting and for immunocytochemistry.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1 Parkin regulates mitochondrial levels of HSD17B10 by a mechanism involving proteasome-independent ubiquitylation. (a) Effect of the siRNA-mediated silencing of endogenous *PARK2*, estimated by real-time PCR with two different primer pairs, on mRNA extracted from HEK293T cells and reverse-transcribed to generate cDNA. (b, c) Effect of the siRNA-mediated downregulation of *PARK2* or *PINK1* (b) or of the proteasome inhibitor epoxomicin (c) on the abundance of HSD17B10 relative to mitoGFP in mitochondrion-enriched fractions subjected to trypsin digestion (short exposure), or cytosol from HEK293T cells (long exposure). The mitochondrial matrix protease PMPCB was used as a loading control. Results are expressed as means \pm SEM. $n = 3$ independent wells from one experiment representative of three carried out in (a); and at least 3 independent experiments in (b, c) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (d) Western blot showing disappearance of a putatively monoubiquitylated HSD17B10 species after trypsin digestion of mitochondrion-enriched fractions under conditions leading to degradation of the OMM receptor TOMM70 but not of the channel subunit TOMM40 or the matrix marker PMPCB. # Signal corresponding to unmodified HSD17B10.

Supplementary Figure S2 HSD17B10 recruits Parkin to the mitochondrion in a PINK1-dependent manner. (a-d) Representative immunocytochemical staining showing (a) the distribution of Parkin and HSD17B10, when overproduced alone in COS7 cells; (b) no mitochondrial translocation of Parkin in COS7 cells coproducing Parkin and mitoGFP or DLST; (c) colocalization of ubiquitin with mitochondrial aggregates immunopositive for Parkin and HSD17B10 in COS7 cells overproducing both proteins; (d) no mitochondrial translocation of Parkin in COS7 cells coproducing Parkin and HSD17B10 following siRNA-mediated silencing of the *PINK1* gene. (e) Analysis of TMRM fluorescence intensity in transfected COS7 cells with and without CCCP treatment for 6 hours. $n \geq 150$ cells from one experiment representative of three carried out. (f) Effect of HSD17B10 overproduction or downregulation on the

mitochondrial accumulation of endogenous PINK1 (short and long exposures) in HEK293T cells. $n = 3$ independent experiments. Results are expressed as means \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus the “Control siRNA” condition. Scale bar: 10 μm .

Supplementary Figure S3 The autophagy-related markers p62/SQSTM1 and LC3 are not recruited to perinuclear mitochondrial aggregates in cells coproducing Parkin and HSD17B10. Representative immunofluorescence staining and quantification of the percentage of cells showing colocalization of Parkin with (a) the ubiquitin-binding protein p62/SQSTM1, an adaptor for ubiquitin-proteasome- and autophagy-mediated degradation, or (b) the autophagosomal adaptor LC3 in COS7 cells coproducing Parkin and HSD17B10, or transfected with exogenous Parkin and treated with CCCP for 6 hours. Note the massive colocalization of p62 and LC3-positive puncta with Parkin-positive mitochondrial aggregates in cells treated with CCCP but not in cells coproducing Parkin and HSD17B10. Mitochondria were visualized with MitoTracker DeepRed, PMPCB or HSD17B10. Results are expressed as means \pm SEM. $n = 3$ independent wells from one experiment representative of three carried out, with 90 cells scored from each well. *** $P < 0.001$. Scale bar: 10 μm .

Supplementary Figure S4 Mitochondrial translocation of Parkin occurs independently of the cytoskeleton in cells overproducing HSD17B10. Effect of microtubule (nocodazole +) or actin cytoskeleton (cytochalasin D +) disruption on the mitochondrial aggregation triggered by Parkin in COS7 cells also producing HSD17B10 (left panels and graphs) or treated with CCCP (16 h) (middle panels and graphs). Less mitochondrial aggregation upon CCCP treatment and less perinuclear accumulation of the Parkin substrate p38/JTV-1/AIMP2 were observed with nocodazole than in untreated cells. Results are expressed as means \pm SEM. $n = 4$ wells from two independent experiments, 120-330 cells scored. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Scale bar: 10 μm .

Supplementary Figure S5 HSD17B10 interacts with Parkin at the TOM machinery in neuronally differentiated cells. (a) Representative FRET images and corresponding quantitative analysis for the indicated donor-acceptor pairs in PC12-*tet-off*-Parkin cells induced to differentiate with nerve growth factor and treated with CCCP (2 h) and with Dox, where indicated. Pseudocolor scale: FRET efficiency for each individual pixel; E: mean FRET efficiency within the ROI; N: nucleus. Insets show the efficiency of the differentiation procedure. $n = 20$ cells from 3 independent experiments. (b) Quantitative FRET analysis and percentage of cells displaying FRET for the indicated donor (HSD17B10, endogenous)-acceptor (Parkin variants, exogenous) pairs in COS7 cells treated with CCCP (6 h). $n = 20$ cells from one of three independent experiments. Results are expressed as means \pm SEM. *** $P < 0.001$ versus negative control: in (a), TOMM70A/HSD17B10 in the Dox - condition for donor/HSD17B10 pairs; HSD17B10/Parkin in the Dox + condition for donor/Parkin pairs; in (b), HSD17B10/Parkin. Scale bar: 10 μm .

Supplementary Figure S6 HSD17B10 impairs the binding of Drp1 close to PINK1 on depolarized mitochondria. Representative FRET images, illustrating the effect of HSD17B10 overproduction on the molecular proximity of PINK1 (endogenous, donor) and Drp1 (exogenous, acceptor) in COS7 cells. Pseudocolor scale: FRET efficiency for each individual pixel; E: mean FRET efficiency within the ROI; N: nucleus. Scale bar: 5 μm .

Supplementary Figure S7 HSD17B10 gene expression is strong in the regions of the brain relevant to PD. (a) Comparison of HSD17B10 transcript levels with those for tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in dopamine biosynthesis, in different regions of the human brain (Allen Human Brain Atlas): PrG, precentral gyrus; CA1, CA1 field of the hippocampus; GPe/i, external/internal segment of the globus pallidus; BCd, body of the caudate nucleus; Acb, nucleus accumbens; Pu, putamen; AHA,

anterior hypothalamic area; SO, supraoptic nucleus; SbT, subthalamic nucleus; VT, ventral thalamus; SN, substantia nigra; VTA, ventral tegmental area; Cb-V, anterior lobe of the cerebellum; LC, locus coeruleus; DMV, dorsal motor nucleus of the vagus. Values correspond to mean z-scores (\pm SEM) for 2-6 human brains. **(b)** HSD17B10 transcript distribution across a representative human brain, according to the regional z-scores.

Supplementary table 1. Antibodies used for western blotting

Primary antibodies			
Type	Company	Host	Dilution
Actin	Sigma	rabbit	1:1000
c-Myc (clone 9E10)	Santa Cruz Biotechnologies	mouse	1:600
Cytochrome c (clone 7H8.2C12)	BD Pharmingen	mouse	1:1000
V5 (clone SV5-Pk1)	Abcam	mouse	1:2000
HA (clone 16B12)	BioLegend	mouse	1:1000
α -tubulin (DM1A)	Abcam	mouse	1:2000
Drp1 (Dlp1)	BD Pharmingen	mouse	1:2000
Mfn2	Abcam	rabbit	1:1000
Opa1	BD Pharmingen	mouse	1:1000
TOMM70	Abcam	mouse	1:4000
TOMM40 (clone H7)	Santa Cruz Biotechnologies	mouse	1:500
GFP	Abcam	rabbit	1:4000
HSD17B10 (clone 5F3)	Abcam	mouse	1:1000
PARKIN (clone Park8)	Millipore	mouse	1:2000
			1:12000*
PINK1	Novus	rabbit	1:2500
PMPCB	Proteintech	rabbit	1:4000
Respiratory chain complexes (Total OXPHOS)	Mitosciences	mouse	1:1000
Ubiquitin (clone 16B12)	Babco	mouse	1:1000
VDAC1	Abcam	rabbit	1:1000
Secondary antibodies			
Type	Company	Host	Dilution
CY3-conjugated anti-mouse/rabbit	Sigma	sheep	1:1000
Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse/rabbit	Invitrogen	goat	1:1000
Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse/rabbit	Jackson ImmunoResearch	goat	1:50000
IRDye 680RD/800CW-conjugated anti-mouse/rabbit	Li-Cor	donkey	1:10000

*Dilution used for ubiquitylation assays.

Supplementary table 2. Antibodies used for immunocytochemical staining

Primary antibodies			
Type	Company	Host	Dilution
PARKIN, clone Park8	Millipore	mouse	1:1000
PARKIN	Millipore	rabbit	1:7000
TOMM20	Abcam	mouse	1:1000
TOMM20	Santa Cruz	rabbit	1:500
TOMM22	Abcam	mouse	1:5000
TOMM22	Atlas Antibodies	rabbit	1:1000
HSD17B10 (clone 5F3)	Abcam	mouse	1:2000
HSD17B10	Abcam	rabbit	1:1000
HSD17B10	Abcam	goat	1:500
p62/SQSTM-1	Abcam	mouse	1:5000
TOMM70A	Sigma	rabbit	1:200
TOMM70A	Abcam	mouse	1:2000
TOMM40	Santa Cruz	rabbit	1:100
TOMM40 (clone D2)	Santa Cruz	mouse	1:200
PMPCB	Proteintech	rabbit	1:1000
VDAC1	Abcam	rabbit	1:500
PINK1	Novus Biologicals	rabbit	1:2500
Actin	Abcam	rabbit	1:1000
β -tubulin	Abcam	mouse	1:2000
Anti-FLAG (clone M2)	Sigma	mouse	1:10000
Ubiquitin	DAKO	rabbit	1:100
Drp1 (Dlp1)	BD Pharmingen	mouse	1:2000
Secondary antibodies			
Type	Company	Host	Dilution
Alexa Fluor 488 anti-mouse/rabbit/goat	Invitrogen	goat/donkey	1:4000; 1:10000*
Alexa Fluor 568 anti-mouse/rabbit/goat	Invitrogen	goat/donkey	1:4000; 1:10000*; 1:30000*
Alexa Fluor 633 anti-mouse/rabbit	Invitrogen	goat	1:500
CY3-conjugated anti-mouse/rabbit	Sigma	sheep	1:4000

*Dilution used for FRET studies

I.3. La Parkine contrôle l'import mitochondrial des protéines à pré-séquences

Article 3 : A molecular biosensor for mitochondrial import efficiency reveals defects in PINK1/Parkin-linked Parkinson's disease (Soumis)

L'import mitochondrial est un processus central du métabolisme à la réponse au stress et à la physiologie des mitochondries. Un défaut de ce processus est suspecté jouer un rôle dans la pathogenèse de plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie de Parkinson. Nous savons également que la Parkine est capable de faciliter l'adressage mitochondrial d'un de ses substrats, l'enzyme mitochondriale HSD17 β 10, dans le but de maintenir ses niveaux constants. Basé sur ces observations, et sur la proximité entre Parkine, PINK1 et la machinerie TOM, nous avons l'hypothèse que la Parkine pourrait réguler de manière général l'import des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytoplasme à travers la machinerie TOM.

Pour cela, nous avons développé en collaboration avec le laboratoire de chémo-génétique Servier-Diverchim, situé à l'ICM, un biosenseur moléculaire basé sur la technique de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) permettant d'étudier dans des cellules vivantes l'import mitochondrial des protéines à pré-séquences. Ce biosenseur est constitué d'une séquence d'adressage mitochondriale permettant sa reconnaissance par le récepteur Tom20, d'un domaine GFP et d'un domaine Luciférase issus de *Renilla reniformis* permettant l'émission du signal bioluminescent par transfert d'énergie. Des domaines de dégradation de type Dégron et/ou PEST ont également été ajoutés afin d'induire sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Protégé de la dégradation par la molécule « Shield1 », le biosenseur est reconnu par le récepteur Tom20, importé à la matrice mitochondriale et clivé par la protéase MPP. Ceci permet une émission d'un signal de bioluminescence uniquement en présence du substrat de la luciférase.

Après avoir confirmé la sensibilité et la spécificité du biosenseur, je l'ai utilisé dans le but d'étudier le rôle de la Parkine dans le processus d'import mitochondrial.

La surexpression de la Parkine, mais pas des mutants de la protéine portant des mutations retrouvées chez des patients, facilite son import. De plus, la surexpression d'une Parkine mimant la phosphorylation de sa Ser65 a un effet plus important que la Parkine « normale ». De plus cet effet est mimé par la surexpression d'une ubiquitine mimant aussi la phosphorylation de sa Ser65 et est aboli par la surexpression d'une ubiquitine incapable de former des chaînes longues, suggérant que ce rôle de la Parkine dépend de sa fonction d'E3 ubiquitine-protéine ligase et de la présence d'ubiquitine fonctionnelle.

J'ai par la suite utilisé cette sonde sur différents fibroblastes humains afin de valider l'effet fonctionnel de la perte de fonction de la Parkine et de PINK1, retrouvée chez les patients, sur l'efficacité de l'import mitochondrial. Par cette approche, j'ai montré que l'import était diminué dans certains fibroblastes humains issus de patients portant des mutations du gène *PARK2*, et que cet effet était compensé par la surexpression d'une ubiquitine « phosphore-mimétique » chez un des fibroblastes étudié, dont l'effet était le plus grand.

Ensemble, ces résultats confirment l'hypothèse plaçant la Parkine dans un niveau de contrôle de la qualité mitochondriale original, en plus de ses rôles dans le contrôle de la dégradation de composants mitochondriaux spécifiques ou d'organites entiers et de biogenèse mitochondriale.

1 **The PINK1 kinase-driven Parkin ubiquitin ligase regulates mitochondrial import**

2 Maxime Jacoupy¹⁻⁴, Denis Guedin⁴⁻⁶, Emeline Hamon-Keromen¹⁻⁴, Francis Cogé⁴⁻⁶, Zoi Erpapazoglou¹⁻
3 ⁴, Jean-Christophe Corvol^{1-4,7}, Olivier Nosjean⁶, Clotilde Mannoury La Cour⁶, Mark J. Millan⁶, Jean A
4 Boutin⁶, Alexis Brice¹⁻⁴, Clément A Gautier^{4-6*§}, Olga Corti^{1-4*§}

5

6

7

8 ¹Inserm, U1127, F-75013, Paris, France

9 ²CNRS, UMR 7225, F-75013, Paris, France

10 ³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1127, F-75013, Paris, France

11 ⁴Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

12 ⁵Laboratoire de Chémogénétique Servier-, F-75013, Paris, France

13 ⁶Institut de Recherches SERVIER, Croissy-sur-Seine

14 ⁷Assistance-publique Hôpitaux de Paris, Inserm, CIC-1422, Department of Neurology, Hôpital Pitié-
15 Salpêtrière, F-75013, Paris, France

16 *These authors contributed equally to this work

17 §corresponding authors:

18 olga.corti@upmc.fr , +33 1 57 27 46 51

19 clement.gautier.vwr@servier.com, +33 1 57 27 47 36

20

21

22 Running title: Parkin enhances mitochondrial import

23 Character count: 23984

24

25 Mitochondria contain over a thousand proteins, most of which are encoded by nuclear genes and must
26 be imported from the cytosol. Little is known about the cytosolic events regulating mitochondrial protein
27 import, partly due to the lack of appropriate tools for its assessment in living cells. We engineered an
28 inducible biosensor for monitoring the main presequence-mediated import pathway with a quantitative,
29 luminescence-based readout. This tool was used to investigate the regulation of mitochondrial import by
30 the PINK1 kinase-driven Parkin ubiquitin ligase, which is dysfunctional in autosomal recessive
31 Parkinson's disease. Mitochondrial import was stimulated by normal Parkin, but not by disease-causing
32 Parkin variants. The effect of Parkin was dependent on its activation by PINK1, and antagonized by the
33 ubiquitylase USP30. Mitochondrial import efficiency was abnormally low in the fibroblasts of patients
34 with *PINK1*- and *PARK2*-linked Parkinson's disease, and was restored by phosphomimetic ubiquitin. A
35 loss of mitochondrial import regulation by PINK1 and Parkin may underlie the pathophysiology of
36 Parkinson's disease, providing novel opportunities for therapeutic intervention.

37

38 Mitochondria fulfill crucial functions in energy production and metabolism, and constitute platforms for
39 the development of protective homeostatic responses to cellular stress. They also play a key role in the
40 control of apoptotic cell death. Mitochondria contain over a thousand proteins, almost 99% of which are
41 encoded by nuclear genes. They are synthesized as precursors on cytosolic ribosomes, then
42 transferred into the organelle by the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM), for sorting
43 to their final destination in one of the four submitochondrial compartments by specific molecular
44 machineries¹. The disruption of mitochondrial import is thought to underlie various neurodegenerative
45 diseases, including Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease and
46 Parkinson's disease (PD)²⁻⁸. The species of α -synuclein accumulating in the brains of most PD patients
47 have been shown to bind with high affinity to the TOM20 subunit of the TOM complex, thereby impairing
48 protein import and mitochondrial function⁸. The mitochondrial serine/threonine kinase PINK1 and the
49 cytosolic ubiquitin-protein ligase Parkin, which are dysfunctional in autosomal recessive PD, function
50 together as a molecular quality control system, coupling the loss of mitochondrial import efficiency via
51 the TOM machinery to the degradation of dysfunctional mitochondria (mitophagy) under conditions of
52 severe mitochondrial stress⁹. This process involves the stabilization of PINK1 in close proximity to the
53 TOM complex, the recruitment and activation of Parkin through the Ser65 phosphorylation of both
54 Parkin and ubiquitin, and the Parkin-mediated ubiquitylation of a series of outer mitochondrial
55 membrane (OMM) proteins⁹⁻¹³. PINK1 and Parkin also regulate several aspects of mitochondrial
56 biogenesis^{14, 15}. However, it remains unclear whether they modulate mitochondrial import.

57 Two thirds of all mitochondrial proteins are targeted to the mitochondria by a positively charged N-
58 terminal mitochondrial targeting signal (MTS), via the presequence pathway, in which they are
59 recognized by the TOM20 and TOM22 receptors, transferred to the TOM40 channel and directed to the
60 presequence translocase of the inner mitochondrial membrane (TIM). The proteins are pulled into the
61 matrix through the TIM23 channel, in a process dependent on mitochondrial transmembrane potential
62 ($\Delta\psi_{mit}$), the presequence translocase-associated motor (PAM) and the ATP-dependent mitochondrial

63 heat-shock protein 70. They are then generally processed by the matrix mitochondrial processing
64 peptidase MPP, which removes the MTS (**Fig. 1A**). We developed a novel tool for assessing the roles
65 of PINK1 and Parkin in the regulation of this import pathway. We used the properties of fusions between
66 the *Renilla reniformis* green fluorescent and luciferase proteins (RGFP, RLuc)¹⁶ to engineer a molecular
67 biosensor targeted to mitochondria by a classical MTS and generating a robust bioluminescent signal
68 only after import into the organelle and removal of the MTS. Using this molecular biosensor in a
69 bioluminescence-based cellular assay, we found that PINK1 and Parkin jointly facilitated mitochondrial
70 protein import through the TOM complex. We also found that mitochondrial protein import efficiency was
71 abnormally low in cells derived from PD patients with *PARK2* or *PINK1* mutations, suggesting that the
72 loss of this regulatory function of PINK1 and Parkin contributes to the pathophysiology of PD.

73

74 **Results**

75 When RGFP and RLuc interact, they generate green bioluminescence through resonance energy
76 transfer, converting most of the blue light emitted into green light. In addition to a shift in wavelength,
77 this interaction induces a strong cooperative effect, leading to a 40-fold increase in the intensity of the
78 bioluminescent signal in the presence of the low-quantum yield substrate coelenterazine 400A
79 (CLZ400A)¹⁶. This process is most efficient when RGFP is at the N-terminus of the fusion protein, and is
80 much less efficient if short N-terminal extensions are added to such chimeric proteins. Based on these
81 principles, we designed two inducible modular biosensors (Probes 1 and 2) predicted to yield a strong
82 bioluminescent signal in the presence of CLZ400A only after import and the subsequent proteolytic
83 removal of the MTS in the mitochondrial matrix (**Fig. 1B,C**). Each of these probes consisted of (1) an N-
84 terminal cleavable MTS from the human dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD), followed by (2) an
85 RGFP-RLuc fusion, from which the MTS was separated by a linker region containing a cMyc-tag, and (3)
86 a C-terminal conditional FKBP-based destabilizing domain (DD) targeting the probe for proteasomal
87 degradation under basal conditions, and stabilizing it in the presence of the small molecule Shield1¹⁷.
88 Probe 2 also contained a PEST motif from mouse ornithine decarboxylase to accelerate its degradation,
89 as a means of optimizing the signal-to-noise ratio and limiting potential toxicity^{18, 19}. We also generated
90 a cytosolic control probe based on the backbone of Probe 1 but lacking the MTS (Probe 3).

91 These probes were validated by the transient transfection of HEK293T cells. Monitoring of the
92 fluorescent signal after the addition of Shield1 to the culture medium revealed a time-dependent
93 increase in fluorescence for Probes 1 and 2, with Probe 1 having both a stronger signal and higher
94 background in the absence of induction (Shield1 -, **Fig. 2A**). The colocalization of the probes with the
95 mitochondrial fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) confirmed that they were
96 targeted to the mitochondria (**Fig. 2B**). In cells expressing particularly high levels of Probe 1, the TMRM
97 signal was very weak, indicating a decrease in $\Delta\psi_{mit}$, possibly due to the reported toxicity of RGFP at
98 high concentrations²⁰. We then set up an assay for quantitative evaluation of the bioluminescent probe

99 signals and their dependence on mitochondrial protein import. The addition of CLZ400A to the cell
100 culture medium triggered the emission of the expected bioluminescent signal in the presence of Shield1
101 (**Fig. 2C**). Cell treatment with the protonophore carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP),
102 which dissipates $\Delta\psi_{mit}$ and, thus, the driving force for import, greatly decreased the intensity of the
103 bioluminescent signals of Probes 1 and 2. By contrast, the signal of Probe 3 was not affected by CCCP,
104 consistent with its cytosolic distribution (**Fig. 2B,C**). We used Probe 2 in most of the subsequent
105 experiments, because it provided the best signal-to-noise ratio. We validated the specificity of this probe
106 for the presequence mitochondrial protein import pathway by assessing the impact of siRNA-mediated
107 silencing of the TOM20 receptor, the channel subunit of the TIM23 complex, and the β subunit of MPP
108 (**Fig. 2D** and **Supplementary Fig. 1A**). Such silencing decreased the intensity of the probe signal by 40
109 to 60%, consistent with lower levels of import. Under these experimental conditions, the abundances of
110 proteins representative of the various submitochondrial compartments remained similar, excluding more
111 global effects on mitochondrial turnover (**Supplementary Fig. 1B**). Downregulation of the peripheral
112 TOM70 receptor, which recognizes proteins with internal mitochondrial targeting information, increased
113 the intensity of the probe signal by almost 70%. This suggests that there is competition between the
114 TOM20- and TOM70-dependent pathways, through the shared TOM40 channel, and that TOM
115 subcomplexes with a lower molar ratio of TOM70 to TOM40²¹ may translocate MTS-carrying precursors
116 more efficiently. Finally, we evaluated the effect of increasing amounts of the mitochondrial matrix
117 enzyme 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase 10 (HSD17B10), which we thought might interfere with the
118 mitochondrial import of Probe 2, as it is also imported via the presequence pathway²². HSD17B10
119 overproduction led to a dose-dependent decrease in the bioluminescent signal of Probe 2, indicating
120 competition for import through the TOM20-dependent pathway (**Fig. 2E**). Complementary biochemical
121 approaches confirmed the expected mitochondrial location of the probe, and its stabilization by
122 proteasome inhibition or Shield1 (**Supplementary Fig. 1C,D**).

123 PINK1 forms a complex with the TOM machinery of dysfunctional mitochondria. The functional
124 significance of this complex remains unclear, but we and others have suggested that it may play a role
125 in Parkin recruitment to mitochondria²³⁻²⁵. We have also shown that Parkin interacts with HSD17B10,
126 PINK1 and the TOM machinery of functional mitochondria, and we have suggested that this interaction
127 facilitates the mitochondrial import of HSD17B10²⁶. We therefore used Probe 2 to investigate the
128 possibility that Parkin and PINK1 coregulate the presequence import pathway in a more general
129 manner. Parkin overproduction in HEK293T cells increased the bioluminescence emission of Probe 2
130 by almost 50%, whereas the downregulation of Parkin or PINK1 had the opposite effect, suggesting that
131 these proteins work together to facilitate mitochondrial protein import (**Fig. 3A**, and **Supplementary Fig.**
132 **2A**). This effect was observed whether the bioluminescence was normalized against the global
133 fluorescence of the probe or the intensity of the MitoTracker signal; it was not, therefore, related to
134 general changes in mitochondrial abundance (**Supplementary Fig. 2B**). Moreover, Parkin reversed the
135 mitochondrial import defects associated with production of large amounts of HSD17B10 (**Fig. 3B** and
136 **Supplementary Fig. 2C**). Probe 2 import was not affected by a UBL domain-deficient Parkin variant, or
137 by any of the nine PD-related variants that we previously found to be unable to associate with the TOM
138 complex in Förster resonance energy transfer (FRET) experiments in cells treated with CCCP²⁵ (**Fig. 3C**
139 and **Supplementary Fig. 2D**). Most of these variants (K161N, K211N, R275W, C418R, C441R, Δ UBL)
140 have little or no ubiquitylation capacity, based on *in vitro* assays for autoubiquitylation^{27, 28}, substrate
141 ubiquitylation²⁹, or ubiquitin chain assembly^{29, 30}.

142 The PINK1-dependent phosphorylation of the Ser65 residues of ubiquitin and Parkin plays a crucial role
143 in activating and maintaining the E3 ubiquitin ligase activity of Parkin, through a complex allosteric
144 mechanism triggering conformational changes in an otherwise autoinhibited protein^{11-13, 30-38}. The
145 Trp403Ala Parkin mutation also weakens autoinhibition, promoting E3 activity³². Co-production of the
146 Parkin Ser65Ala variant, which cannot be phosphorylated, abolished the Parkin-dependent
147 enhancement of the bioluminescent signal emitted by Probe 2, whereas phosphomimetic Parkin

148 Ser65Glu or Parkin Trp403Ala had a stronger signal-enhancing effect than native Parkin (almost +25%
149 and +15%, respectively; **Fig. 3D** and **Supplementary Fig. 2E**). Moreover, production of the
150 phosphomimetic ubiquitin variant Ser65Asp enhanced the effect of overproduced Parkin (+40%) and
151 tended to mimic Parkin overproduction in cells with endogenous Parkin levels (**Fig. 3E** and
152 **Supplementary Fig. 2F**). In these cells, the effect of Ub Ser65Asp was reversed by Parkin silencing,
153 demonstrating a dependence of its action on the E3 activity of endogenous Parkin (**Fig. 3F**). By
154 contrast, the non-phosphorylatable Ub Ser65Ala decreased the intensity of the Probe 2 signal (-70%),
155 consistent with a dominant negative effect of this variant¹³, and almost abolished the effect of Parkin
156 (only +10% versus +60% without Ub Ser65Ala) (**Fig. 3E** and **Supplementary Fig. 2G**). Similarly, the
157 production of a lysine-less ubiquitin variant that inhibits ubiquitin-chain extension³⁹ prevented the
158 stimulation of import by Parkin (**Fig. 3G** and **Supplementary Fig. 2H**).

159 The OMM ubiquitylase USP30 has been shown to antagonize the Parkin-dependent ubiquitylation of
160 proteins in dysfunctional mitochondria and to block mitophagy⁴⁰. We found that USP30 overproduction
161 greatly reduced the bioluminescence of Probe 2, in both the presence (-70% versus +Parkin) and
162 absence (50% versus control conditions) of exogenous Parkin, whereas the catalytically inactive USP30
163 Cys77Ser mutant had no effect, suggesting that USP30 counteracts the facilitation of protein import by
164 Parkin (**Fig. 3H** and **Supplementary Fig. 2I-K**).

165 Finally, we investigated mitochondrial import efficiency in fibroblasts obtained from PD patients with
166 *PARK2* ($n=7$) or *PINK1* ($n=1$) mutations, comparing the results obtained with those for fibroblasts from
167 control individuals ($n=6$; **Supplementary Table 1**). Probe 2 was barely detectable in these cells, which
168 were transfected less efficiently than HEK293T cells. We therefore used Probe 1, for which a consistent
169 signal was obtained, with no toxicity (**Supplementary Fig. 3**). The mean intensity of the Probe 1
170 bioluminescent signal tended to be lower in fibroblasts from *PARK2/PINK1* patients than in those from
171 control individuals, although this difference was not statistically significant (-25%, **Fig. 4A**). In cells from
172 four patients, the signal was 40% to 75% lower than the mean signal in control cells. These patients

173 carried either a homozygous *PINK1* mutation leading to the Gln456* substitution associated with a
174 kinase-dead protein⁴¹ (Patient 8, **Supplementary Table 1**) or compound *PARK2* heterozygous
175 mutations associated with an inactive truncated protein (allele 1) and the Arg42Pro Parkin variant, which
176 relieves UBL-mediated autoinhibition and preserves enzymatic activity (allele 2; Patients 1-3,
177 **Supplementary Table 1**)^{29, 30, 42}. The other patients with *PARK2* mutations carried inactivating
178 deletions or missense mutations, suggesting that an abnormal protein with residual activity may be
179 more deleterious than an inactive protein. The mean bioluminescent signal of Probe 1 in Patients 1-3
180 was significantly weaker than that in control individuals (-60%), suggesting that Arg42Pro Parkin has
181 deleterious effects on the import process (**Fig. 4B**). We hypothesized that phosphomimetic Ub
182 Ser65Asp might enhance the residual activity of this variant. We therefore overproduced this protein in
183 cells from Patient 3 and observed the rescue of the bioluminescence signal of Probe 1 (+150% versus
184 that in a patient with *PARK2* mutation but no Ub Ser65Asp) relative to the values obtained for Control 1.
185 We found that the overproduction of this protein had a stronger effect than normal Parkin (+60% versus
186 a patient with *PARK2* mutation but without Ub Ser65Asp, **Fig. 4C**).

187

188 Discussion

189 Recent studies have highlighted the remarkable plasticity of the mitochondrial protein import process in
190 response to metabolic requirements and stress⁴³, but our knowledge of the cytosolic mechanisms
191 regulating this process in mammalian cells remains poor. Using a novel tool for the analysis of one of
192 the major mitochondrial protein import pathways in living cells, we showed that this pathway was
193 facilitated by the PINK1 kinase-driven Parkin ubiquitin ligase (**Fig. 5**). This regulation was robust, as its
194 antagonism through the depletion of Parkin or PINK1, or the overproduction of a non-phosphorylatable
195 ubiquitin variant or the ubiquitylase USP30, impaired mitochondrial protein import to a similar extent to
196 the downregulation of intrinsic components of the presequence pathway. The PINK1/Parkin system
197 modulated mitochondrial import in cells not subjected to external stress. This finding contrasts with
198 those for other regulatory functions exerted by this system in mitochondrial quality control under
199 conditions of acute mitochondrial stress^{44, 45}, and suggests that this regulation occurs in response to
200 physiological fluctuations in mitochondrial import efficiency. These findings echo those of much earlier *in*
201 *vitro* studies implicating ubiquitin conjugation in the insertion of specific proteins into the OMM^{46, 47}, and
202 they support a more general role of ubiquitylation at the OMM in the posttranslational control of
203 mitochondrial protein import. Previous studies in yeast have identified the ubiquitin-proteasome
204 degradation system as a constitutively active negative regulator of the biogenesis of intermembrane
205 space proteins through competition with their mitochondrial import⁴⁸. Ubiquitin-dependent mechanisms
206 may, thus, regulate mitochondrial protein import at multiple levels, optimizing the adaptation of this
207 process to physiological requirements.

208 Future studies will need to clarify the precise mechanisms by which PINK1/Parkin-dependent
209 ubiquitylation facilitates mitochondrial import. Which proteins are ubiquitylated? By which type of
210 ubiquitin linkage? With what specific consequence for the various stages of mitochondrial import? We
211 previously showed that Parkin oligo/polyubiquitylates HSD17B10 on the OMM and suggested that this
212 modification facilitates HSD17B10 import through the TOM complex in a proteasome-independent

213 manner²⁶. However, this mechanism is unlikely to be general, as it requires direct recognition of the
214 imported protein by Parkin. The posttranslational modification of subunits of the TOM machinery may be
215 a direct means of affecting import efficiency. The phosphorylation by cytosolic kinases is the only
216 modification to date reported to modulate the activity of the TOM machinery in yeast^{43, 49}. However,
217 subunits of the TOM machinery, including the TOM20 and TOM70 receptors in particular, are among
218 the earliest targets for PINK1-driven Parkin-dependent ubiquitylation in severely damaged
219 mitochondria^{24, 25, 40, 50-52}. The ubiquitylation of the TOM receptors in this context leads to their
220 proteasomal degradation and the initiation of mitophagy^{25, 40, 51, 52}. However, if mitochondrial import
221 efficiency is decreased only slightly, this modulation may modulate protein translocation across the
222 OMM. The type of ubiquitin linkage may play a key role in determining the impact of the
223 posttranslational modification, and Parkin has been reported to assemble both canonical ubiquitin
224 chains, through Lys48 and Lys63, and noncanonical chains, involving at least Lys6 and Lys11^{30, 52, 53}.

225 TOM70 is only loosely and transiently associated with the core structure of the TOM complex⁵⁴ and may
226 thus be a preferential target for posttranslational regulatory mechanisms. We and others have shown
227 that Parkin physically associates with the import receptor TOM70^{24, 25, 50} and a number of Parkin-
228 dependent ubiquitylation sites have been identified in this TOM subunit⁵⁰. We found that TOM70
229 downregulation enhanced mitochondrial import through the TOM20-dependent presequence pathway to
230 a similar extent to activation of the PINK1/Parkin system. It is, thus, possible that PINK1 and Parkin
231 promote the translocation of proteins with classical MTS across the TOM40 channel by targeting
232 TOM70 for ubiquitin-dependent proteasomal degradation. This view is supported by the existence of
233 subsets of TOM complexes with different relative ratios of TOM70 and TOM40, identified by size
234 exclusion chromatography²¹ and possibly transporting different categories of proteins. It remains to be
235 determined whether upregulation of the TOM20-dependent import pathway is accompanied by a
236 decrease in the import of proteins guided by internal mitochondrial targeting sequences and TOM70 to
237 the same TOM40 channel.

238 As an alternative or complementary mechanism, the PINK1/Parkin system may stimulate import through
239 the presequence pathway, by targeting the preprotein receptor TOM20. Consistent with this possibility,
240 TOM20 is one of the few proteins reported to be a substrate of both Parkin and USP30^{40, 53}. PINK1 and
241 Parkin have recently been shown to promote derepression of the translation of specific nuclear genome-
242 encoded components of respiratory chain complexes (RCC), through a combination of mechanisms
243 involving TOM20 and other factors¹⁵. Physical association between PINK1 and TOM20 was found to be
244 essential to anchor RCC mRNAs to the OMM and to promote cotranslational import of the encoded
245 proteins through the TOM complex. It remains unclear whether this mechanism involves ubiquitylation
246 by Parkin, but it is tempting to speculate that it plays a more general role in the facilitation of
247 mitochondrial import reported here. Cotranslational import mediated by the localization of mRNA close
248 to the OMM has emerged as a phenomenon of much broader relevance than initially suspected^{15, 55-59}.
249 More than half the mRNAs encoding mitochondrial proteins are located in the vicinity of the
250 mitochondria in yeast⁴⁴⁻⁴⁹, and TOM20 and the MTS of the nascent protein, two essential components
251 of the presequence import pathway, play a key role in mediating this association^{15, 55-59}.

252 In conclusion, through the development of a powerful chemogenetic tool, we were able to identify a new
253 cooperative role of PINK1 and Parkin in the regulation of mitochondrial protein import, thereby
254 broadening our understanding of the mechanisms by which these proteins regulate mitochondrial quality
255 control. The pathophysiological relevance of these findings is supported by the lack of effect on
256 mitochondrial import of a series of PD-related Parkin variants with altered abilities to associate with the
257 TOM complex²⁵, and the lower efficiency of mitochondrial import in cells from PD patients with specific
258 *PINK1* and *PARK2* mutations (**Fig. 5**). Together with the recent implication of α -synuclein in
259 mitochondrial import blockade in PD⁸, our study suggests that defective protein transport through the
260 TOM complex may be a unifying pathway to dopaminergic neuronal degeneration. The novel assay
261 developed here may facilitate identification of neuroprotective compounds preserving the mitochondrial
262 import process, paving the way for new therapeutic approaches.

263 **Methods**

264 **Probes, plasmids and siRNAs** The cDNAs corresponding to Probes 1-3 were obtained by DNA
265 synthesis (Genecust, Dudelange, Luxembourg) as fusions of modules encoding the following
266 protein/protein domains (Fig. 1A): the MTS of human DLD (NP_001276681; amino acids 1 to 36;
267 Probes 1 and 2); RGFP (AF372525; aa 2 to 233; Probes 1-3); a linker region including a cMyc-tag
268 (EEQKLISEEDLGIPPARAT; Probes 1-3); RLuc (P27652 ; amino acids 1 to 311; Probes 1-3); a second
269 linker (GGGSGGGGS; probes 1-3); the human FKBP1A DD domain¹⁷ (NP_000792 ; amino acids 2 to
270 108 with mutations encoding E32G F37V R72G K106E substitutions; Probes 1-3); the mouse ornithine
271 decarboxylase PEST domains^{18, 19} (NP_038622 ; aa 422 to 461; Probe 2). The cDNAs were inserted
272 into the pCl-neo mammalian expression vector (Promega, Madison WI) between the *NheI* and *NotI*
273 sites. The other vectors used were: pcDNA3.1 containing sequences encoding human HA-Parkin or HA-
274 Parkin variants²⁷; HA-Parkin W403A; HA-Parkin, HA-Parkin-S65A/E variants, Flag-ubiquitin-S65A/D
275 variants (kindly provided by N. Matsuda)¹³; V5-HSD17B10²⁶; pEF-HA-UbiK0 (kindly provided by Y.
276 Yarden); pCAGGS containing sequences encoding human Flag-USP30 and Flag-USP30-C77A (kindly
277 provided by B. Bingol)⁴⁰. The following siRNAs were used at a final concentration of 20 nM: AllStars
278 negative control siRNA (1027281) and validated TOM70 (SI00301973), TOM20 (SI00301959), TIM23
279 (SI05217905)-specific siRNA (Qiagen), MPPB (L-004747-00-0005)-specific siRNA (Dharmacon), RNAi
280 negative control (12935-200), PINK1 (HSS127945) and Parkin (HSS107593)-specific stealth siRNA
281 (Thermo Fisher).

282 **Cell culture, transfection and treatments** HEK239T cells were cultured in DMEM-GlutaMAX medium
283 (Thermo Fisher) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo
284 Fisher). HEK293T cells were transfected in the presence of Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher),
285 according to the manufacturer's instructions. Human skin fibroblasts were obtained from PD patients
286 and healthy individuals by routine clinical procedures, with prior written informed consent and the
287 approval of the local ethics committee (*Comité de Protection des Personnes "Ile de France"*). Patients

288 were screened for *PARK2* mutations by exon dosage methods and bidirectional Sanger sequencing of
289 the entire coding sequence with an ABI 3730 automated sequencer, as previously described⁶⁰.
290 Fibroblasts cultured as described for HEK293T cells were transfected by electroporation with a Neon™
291 Transfection System (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Where indicated, cells
292 were incubated with 10 μM CCCP (Sigma) for 24 h; 0.5 μM fresh Shield1 (Clontech) for 7 h
293 (Supplementary Fig. 1B) or 24 h; 5 μM MG132 (Sigma) for 7 h; or 5 μM (HEK293T) or 25 μM (primary
294 fibroblasts) CLZ400A immediately before bioluminescence measurement. Where indicated, living cells
295 were incubated with mitochondrial dyes (Invitrogen) at a concentration of 10 nM (TMRM, T668) or 200
296 nM (MitoTracker Deep Red), at 37°C for 30 minutes.

297 **Fluorescence microscopy and bioluminescence assay** Images of probe expression and
298 colocalization with mitochondrial dyes were obtained with an inverted spinning disk microscope from Till
299 photonics fitted with a Olympus 100x oil immersion objective (N.A 1.4). Probe induction was analyzed
300 with ImageJ software, on fluorescence images from at least 15 cells per condition. For bioluminescence
301 assays, cells were plated in black precoated 96-well plates (Greiner Bio One), at a density of 25,000
302 (HEK293T) or 10,000 cells/well (primary fibroblasts). They were analyzed 48 h after transfection in
303 Hank's Balanced Salt Solution (Invitrogen) containing 20 mM Hepes (Invitrogen), with a FDSS 7000
304 Functional Drug Screening System (Hamamatsu). A control condition with CCCP treatment was
305 systematically included in each experiment. Bioluminescence signals were collected every second for
306 five minutes after the addition of CLZ400A to the cells, and normalized relative to the total RGFP
307 fluorescence of the probe in each well, recorded at an excitation wavelength of 470 nm, and an
308 emission wavelength of 510 nm. For Supplementary Fig. 2B, bioluminescence signals were also
309 normalized relative to the intensity of MitoTracker Deep Red staining, captured with the Odyssey
310 Imaging (Li-COR) system and quantified with Li-COR Image Studio. On graphical representations of
311 bioluminescence peaks, each dot corresponds to the mean peak value for three to eight wells in a
312 single independent experiment, determined as follows: for each well, the peak value was obtained as

313 the mean of the bioluminescence signals recorded during the first 100 seconds normalized against
314 fluorescence, corrected by subtracting the mean signal obtained for cells treated with CCCP (calculated
315 from data for 3-8 wells). In graphical representations of the results for fibroblasts, each number/patient
316 corresponds to the mean peak bioluminescence signal from four to six independent experiments, with
317 six wells per experiment, collected as indicated above.

318 **Subcellular fractionation and western blot analyses** Mitochondrion-enriched fractions were obtained
319 by differential centrifugation, from cells homogenized with a Dounce homogenizer (80 manual strokes)²⁶
320 and subjected to digestion with trypsin (Sigma, 1 µg/mg of protein) for 20 minutes at 37°C. Total protein
321 fractions were obtained from cells lysed at 4°C for 30 minutes in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM
322 NaCl, 1% Triton, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH7.4; Supplementary Fig. 1B)
323 or in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.4 supplemented with
324 phosphatase and protease inhibitors (Complete Cocktail, Thermo Fisher), and centrifuged at 16.1 x g.
325 Proteins were resolved by SDS-PAGE, and analyzed by western blotting with the antibodies indicated
326 in Supplementary Table 2. Proteins were visualized with fluorescent antibodies or by enhanced
327 chemiluminescence (Pierce). Fluorescence/chemiluminescence signals were captured with the
328 Odyssey Imaging (Li-COR) system, detected on a film (ECL, Amersham Hyperfilm) or with the
329 Chemidoc touch Imaging System (Bio-Rad) and quantified with Li-COR Image Studio, Image Lab
330 Software (Bio-Rad) or ImageJ software (NIH).

331 **Quantitative real-time RT-PCR** Total RNA was purified with the RNeasy plus Mini Kit (Qiagen) and
332 reverse-transcribed (1 µg) to generate cDNA (iScript cDNA Synthesis, Bio-Rad). Real-time PCR was
333 performed with the primers indicated in Supplementary Table 3, SsoAdvanced Universal SYBR Green
334 Supermix (Bio-Rad) and the LightCycler 480 System (Roche Applied Science). Results were analyzed
335 with LightCycler 480 sw 1.5 quantification software. The data for each gene of interest were normalized
336 relative to *ACTB* expression.

337

338 **Conflict of interest**

339 The authors have no competing financial interests to declare.

340 **Acknowledgments**

341 We thank Y. Yarden, N. Matsuda and B. Bingol for providing vectors. This work was supported by
342 *Institut national de la santé et de la recherche médicale, Association France Parkinson, Fondation de*
343 *France (Engt 2012 00034508), Fondation ICM, “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06 and*
344 *Institut de Recherches Servier/Les Laboratoires Servier. M.J. was supported by a fellowship from the*
345 *French Ministry of Higher Education and Research and by Association France Parkinson.*

346 **Author contributions**

347 M. J. designed, performed and analyzed the experiments and wrote the manuscript; D. G. and F. G.
348 conceived and designed the probes; E. H-K., Z. E. designed, performed and analyzed the experiments;
349 J-C. C. provided access to human fibroblasts and critically revised the manuscript; M. J. M. and A. B.
350 provided helpful comments and critically revised the manuscript; O. N., C. MLC., J.B. provided helpful
351 comments; C. A. G designed and analyzed the experiments, co-supervised the work and wrote the
352 manuscript. O. C. supervised and coordinated the work, provided funding and wrote the manuscript.

353 **References**

- 354 1. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial
355 proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628-644 (2009).
356
- 357 2. Sokol AM, Sztolszterer ME, Wasilewski M, Heinz E, Chacinska A. Mitochondrial protein
358 translocases for survival and wellbeing. *FEBS Letters* **588**, 2484-2495 (2014).
359
- 360 3. Gottschalk WK, *et al.* The broad impact of TOM40 on neurodegenerative diseases in aging. *J*
361 *Parkinsons Dis Alzheimers Dis* **1**, (2014).
362
- 363 4. Li Q, *et al.* ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein
364 composition and decreases protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
365 *of the United States of America* **107**, 21146-21151 (2010).
366
- 367 5. Bender A, *et al.* TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by alpha-synuclein
368 accumulation in Parkinson's disease. *PLoS One* **8**, e62277 (2013).
369
- 370 6. Yano H, *et al.* Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature*
371 *Neuroscience* **17**, 822-831 (2014).
372
- 373 7. Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Accumulation of
374 amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease
375 brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* **26**, 9057-9068 (2006).
376
- 377 8. Di Maio R, *et al.* Alpha-synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in
378 Parkinson's disease. *Sci Transl Med* **8**, 342ra378 (2016).
379
- 380 9. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's
381 disease. *Neuron* **85**, 257-273 (2015).
382
- 383 10. Kondapalli C, *et al.* PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and
384 stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating serine 65. *Open Biol* **2**, 120080 (2012).
385
- 386 11. Kane LA, *et al.* PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity.
387 *The Journal of Cell Biology* **205**, 143-153 (2014).
388
- 389 12. Kazlauskaitė A, *et al.* Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at
390 Ser65. *The Biochemical Journal* **460**, 127-139 (2014).
391
- 392 13. Koyano F, *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162-166
393 (2014).
394
- 395 14. Shin JH, *et al.* PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in
396 Parkinson's disease. *Cell* **144**, 689-702 (2011).
397
- 398 15. Gehrke S, *et al.* PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component
399 mRNAs on mitochondria outer membrane. *Cell Metab* **21**, 95-108 (2015).
400

- 401 16. Molinari P, Casella I, Costa T. Functional complementation of high-efficiency resonance energy
402 transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells. *The Biochemical*
403 *Journal* **409**, 251-261 (2008).
404
- 405 17. Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, Ooi AG, Wandless TJ. A rapid, reversible, and
406 tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*
407 **126**, 995-1004 (2006).
408
- 409 18. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded
410 proteins: the PEST hypothesis. *Science (New York, NY)* **234**, 364-368 (1986).
411
- 412 19. Li X, *et al.* Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *The*
413 *Journal of Biological Chemistry* **273**, 34970-34975 (1998).
414
- 415 20. Wallace LM, Moreo A, Clark KR, Harper SQ. Dose-dependent toxicity of humanized *Renilla*
416 *reniformis* GFP (hrGFP) limits its utility as a reporter gene in mouse muscle. *Mol Ther Nucleic*
417 *Acids* **2**, e86 (2013).
418
- 419 21. Kunkele KP, *et al.* The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.
420 *Cell* **93**, 1009-1019 (1998).
421
- 422 22. He XY, Merz G, Yang YZ, Mehta P, Schulz H, Yang SY. Characterization and localization of
423 human type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur J Biochem* **268**, 4899-4907 (2001).
424
- 425 23. Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and
426 alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell*
427 **22**, 320-333 (2012).
428
- 429 24. Okatsu K, *et al.* Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase.
430 *Biochemical and Biophysical Research Communications* **428**, 197-202 (2012).
431
- 432 25. Bertolin G, *et al.* The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-
433 dependent mitochondrial clearance. *Autophagy* **9**, 1801-1817 (2013).
434
- 435 26. Bertolin G, *et al.* Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-
436 related enzyme 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 10. *Cell Death Differ* **22**, 1563-
437 1576 (2015).
438
- 439 27. Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's
440 disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation
441 capacity. *Human Molecular Genetics* **15**, 2059-2075 (2006).
442
- 443 28. Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K. Diverse effects of pathogenic
444 mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation *in vitro*. *The Journal of Biological*
445 *Chemistry* **281**, 3204-3209 (2006).
446
- 447 29. Kazlauskaitė A, *et al.* Phosphorylation of Parkin at serine 65 is essential for activation:
448 elaboration of a Miro1 substrate-based assay of Parkin E3 ligase activity. *Open Biol* **4**, 130213
449 (2014).
450

- 451 30. Ordureau A, *et al.* Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial
452 PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell* **56**, 360-375 (2014).
453
- 454 31. Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state.
455 *EMBO J* **32**, 2099-2112 (2013).
456
- 457 32. Trempe JF, *et al.* Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science*
458 (*New York, NY* **340**, 1451-1455 (2013).
459
- 460 33. Sauve V, *et al.* A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *EMBO J* **34**, 2492-2505 (2015).
461
- 462 34. Wauer T, Simicek M, Schubert A, Komander D. Mechanism of phospho-ubiquitin-induced
463 PARKIN activation. *Nature* **524**, 370-374 (2015).
464
- 465 35. Okatsu K, *et al.* Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *The Journal of*
466 *Cell Biology* **209**, 111-128 (2015).
467
- 468 36. Ordureau A, *et al.* Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in
469 mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. *Proceedings of the National*
470 *Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 6637-6642 (2015).
471
- 472 37. Caulfield TR, Fiesel FC, Moussaud-Lamodiere EL, Dourado DF, Flores SC, Springer W.
473 Phosphorylation by PINK1 releases the UBL domain and initializes the conformational opening
474 of the E3 ubiquitin ligase Parkin. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003935 (2014).
475
- 476 38. Kumar A, *et al.* Disruption of the autoinhibited state primes the E3 ligase parkin for activation
477 and catalysis. *EMBO J* **34**, 2506-2521 (2015).
478
- 479 39. Bloom J, Pagano M. Experimental tests to definitively determine ubiquitylation of a substrate.
480 *Methods Enzymol* **399**, 249-266 (2005).
481
- 482 40. Bingol B, *et al.* The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy.
483 *Nature* **510**, 370-375 (2014).
484
- 485 41. Woodroof HI, *et al.* Discovery of catalytically active orthologues of the Parkinson's disease
486 kinase PINK1: analysis of substrate specificity and impact of mutations. *Open Biol* **1**, 110012
487 (2011).
488
- 489 42. Chaugule VK, *et al.* Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J*
490 **30**, 2853-2867 (2011).
491
- 492 43. Harbauer AB, Zahedi RP, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. The protein import machinery
493 of mitochondria-a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab* **19**, 357-372
494 (2014).
495
- 496 44. Vincow ES, *et al.* The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective
497 respiratory chain turnover *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
498 *United States of America* **110**, 6400-6405 (2013).
499

- 500 45. McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, McBride HM, Fon EA. Parkin and PINK1 function in a
501 vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J* **33**, 282-295
502 (2014).
503
- 504 46. Zhuang ZP, Marks B, McCauley RB. The insertion of monoamine oxidase A into the outer
505 membrane of rat liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 591-596 (1992).
506
- 507 47. Zhuang Z, Hogan M, McCauley R. The *in vitro* insertion of monoamine oxidase B into
508 mitochondrial outer membranes. *FEBS Letters* **238**, 185-190 (1988).
509
- 510 48. Bragoszewski P, Gornicka A, Sztolsztener ME, Chacinska A. The ubiquitin-proteasome system
511 regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Molecular and Cellular Biology* **33**,
512 2136-2148 (2013).
513
- 514 49. Schmidt O, *et al.* Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* **144**, 227-
515 239 (2011).
516
- 517 50. Sarraf SA, *et al.* Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to
518 mitochondrial depolarization. *Nature* **496**, 372-376 (2013).
519
- 520 51. Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin mediates proteasome-dependent protein
521 degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of Biological*
522 *Chemistry* **286**, 19630-19640 (2011).
523
- 524 52. Chan NC, *et al.* Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for
525 mitophagy. *Human Molecular Genetics* **20**, 1726-1737 (2011).
526
- 527 53. Cunningham CN, *et al.* USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on
528 mitochondria. *Nature Cell Biology* **17**, 160-169 (2015).
529
- 530 54. Meisinger C, *et al.* Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable
531 Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and
532 import receptors. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 2337-2348 (2001).
533
- 534 55. Corral-Debrinski M, Blugeon C, Jacq C. In yeast, the 3' untranslated region or the presequence
535 of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria.
536 *Molecular and Cellular Biology* **20**, 7881-7892 (2000).
537
- 538 56. Garcia M, Delaveau T, Goussard S, Jacq C. Mitochondrial presequence and open reading
539 frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO Reports* **11**, 285-291 (2010).
540
- 541 57. Kaltimbacher V, Bonnet C, Lecoivre G, Forster V, Sahel JA, Corral-Debrinski M. mRNA
542 localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of
543 a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA* **12**, 1408-1417 (2006).
544
- 545 58. Eliyahu E, *et al.* Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-
546 dependent manner. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 284-294 (2010).
547
- 548 59. Lesnik C, Golani-Armon A, Arava Y. Localized translation near the mitochondrial outer
549 membrane: An update. *RNA Biol* **12**, 801-809 (2015).

550
551
552
553

60. Periquet M, *et al.* Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* **126**, 1271-1278 (2003).

554 **Figure legends**

555 **Figure 1** Genetically encoded reporters for the assessment of protein import through the TOM complex.

556 (A) Molecular components of the presequence import pathway: translocase of the outer mitochondrial
557 membrane (TOM) with its receptor subunits TOM20, TOM22 and the channel subunit TOM40;
558 translocase of inner mitochondrial membrane (TIM23); presequence translocase-associated motor
559 (PAM); mitochondrial processing peptidase (MPP). OMM, outer mitochondrial membrane; IMM inner
560 mitochondrial membrane; IMS, intermembrane space. The TOM70 receptor recognizes proteins with
561 internal mitochondrial targeting information. (B) Probes designed to monitor import through the
562 presequence pathway. MTS, mitochondrial targeting signal; RGFP, green fluorescent protein from
563 *Renilla reniformis*; RLuc, luciferase from *Renilla reniformis*; DD, destabilizing domain of FK506 binding
564 protein (FKBP); PEST, sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)
565 associated with short-lived proteins; the D433A and D434A PEST mutations accelerate degradation. (C)
566 Bioluminescence-based assay for mitochondrial import through the presequence pathway. In the
567 absence of the small molecule Shield1, Probes 1 and 2 are rapidly degraded by the proteasome.
568 Shield1 stabilizes the probes, which are then imported into the mitochondrial matrix through the TOM
569 and TIM complexes. Cleavage of the MTS by MPP leads to a characteristic light emission spectrum due
570 to a BRET effect in the presence of the RLuc substrate coelenterazine 400A (CLZ400A).

571

572 **Figure 2** Validation of mitochondrial import probes for the presequence pathway. (A) Representative
573 fluorescence images and the corresponding quantitative analysis (graph), illustrating the expression of
574 Probes 1 and 2 (RGFP signal) at different time points after the addition of Shield1 to the culture medium
575 of living HEK293T cells, 24 h after transient transfection. $n = 15$ (B) Representative fluorescence
576 images and higher magnifications (framed regions in the overlay) showing the colocalization of each
577 probe (RGFP signal) with the mitochondrial dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) in living
578 cells treated for 24 h with Shield1. Note the loss of TMRM staining in a cell with high levels of Probe 1,

579 and the expected cytosolic localization of Probe 3. **(C)** Quantitative analysis of the bioluminescent
580 signals emitted by Probes 1-3 in HEK293T cells with and without Shield1 and/or CCCP treatment (24
581 h), following the addition of CLZ400A. $n = 6$ wells from one of three independent experiments. **(D)**
582 Silencing of key components of the presequence pathway with specific siRNAs attenuates the
583 bioluminescent signal of Probe 2, whereas downregulation of the TOM70 receptor of the carrier
584 pathway enhances the signal of this probe. $n = 5$ independent experiments. **(E)** Quantitative analysis of
585 the relative bioluminescent signal for Probe 2 in HEK293T cells cotransfected with various amounts of
586 plasmid encoding HSD17B10 (V5 epitope-tagged) and treated with CLZ400A. The western blot
587 illustrates HSD17B10 levels. $n = 5$ wells from one of at least three independent experiments. Results
588 are expressed as means \pm SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ versus vehicle/vehicle (**c**; two-way
589 repeated-measures ANOVA with Tukey's post-hoc test), Control (**D**; one-way ANOVA with Dunnet's
590 post-hoc test), or 1:0 ratio of Probe 2 to HSD17B10-V5 (**E**, two-way repeated-measures ANOVA with
591 Dunnet's post-hoc test). $\#p < 0.05$, $###p < 0.001$ versus Shield1/CCCP. Scale bar: 10 μ m.

592

593 **Figure 3** Parkin modulates the mitochondrial presequence import pathway through its E3 ubiquitin-
594 protein ligase activity. Quantitative analyses of the relative bioluminescent signals for Probe 2 in cells
595 silenced for Parkin or PINK1 or coproducing Parkin (**A**) with or without large amounts of HSD17B10 (**B**),
596 showing the enhancement of import by normal Parkin but not by PD-linked or artificial (Δ Ubl) variants
597 (**C**). Analysis of the impact of PINK1-dependent phosphorylation events and of the E3 ubiquitin-protein
598 ligase activity of Parkin on the facilitation of mitochondrial import (**D-G**). Relief of Parkin autoinhibition by
599 the activating W403A substitution, or by mimicking the PINK1 phosphorylation of Parkin UBL (S65E) (**D**)
600 or ubiquitin (S65D) (**E**) exacerbates the Parkin-dependent enhancement of the bioluminescent signal.
601 By contrast, non-phosphorylatable S65A Parkin or ubiquitin variants abolish the effect of Parkin. Ub
602 S65D mimics the effect of Parkin overproduction in a manner dependent on endogenous Parkin (**F**,
603 Parkin siRNA). (**G**) The lower intensity of the bioluminescent signal of Probe 2 observed with the lysine-

604 less Ub K0 variant indicates that the effect of Parkin is mediated by polyubiquitylation. (H) The
605 mitochondrial ubiquitin-specific protease USP30 antagonizes the effect of Parkin, whereas the inactive
606 C77A USP30 variant has no effect. $n = 3-6$ independent experiments. Results are expressed as means
607 \pm SEM. Data were analyzed by one-way (A,C,D) or two-way ANOVA (B,E-H) with Dunnet's (A,C,F,G)
608 or Holm-Sidak's (B,D,E,H) post-hoc tests. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. ns: non-significant. The
609 schematic diagram illustrates Parkin with its main domains and the location of the PD-linked (yellow
610 circles) or artificial (blue circles) variants examined.

611

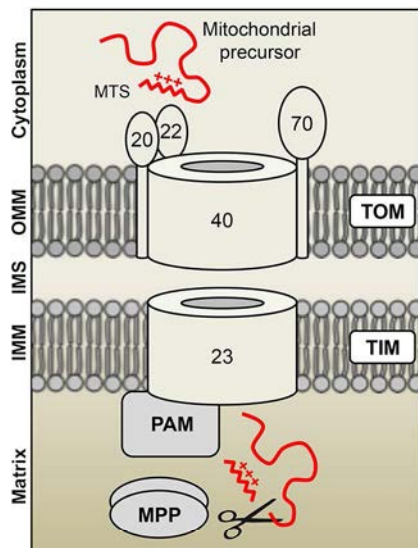
612 **Figure 4** Defects of the mitochondrial preimport pathway in fibroblasts from a subset of PD patients with
613 *PARK2* mutations are rescued by phosphomimetic ubiquitin. (A,B) Mean bioluminescent signal for
614 Probe 1 in control individuals and *PARK2/PINK1* patients (A) or a subset of *PARK2* patients (B),
615 showing a weaker signal in Patients 1-3, associated with presence of the partially functional R42P
616 substitution. The numbers on the graphs indicate the mean signals for individual patients, as presented
617 in Supplementary Table 1, with $n = 4-6$ independent experiments. (C) The overproduction of
618 phosphomimetic Ub S65D normalizes the signal in cells from Patient 3 to a level similar to that in the
619 cells of Control 1. Exogenous Parkin has a similar, but weaker effect. $n = 4$ wells from one of two
620 independent experiments. Results are expressed as means \pm SEM. $**p < 0.01$, or not significant (ns)
621 versus control individuals (A, Student's *t* test) or the conditions indicated (B,C, one-way ANOVA with
622 Dunnet's (B) or Holm-Sidak's (C) post-hoc tests).

623

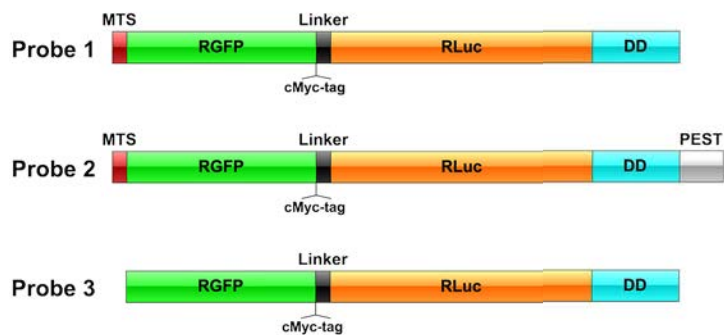
624 **Figure 5** Model illustrating facilitation of mitochondrial protein import by the PINK1 kinase-driven Parkin
625 ubiquitin ligase. Under physiological reductions in mitochondrial protein import efficiency, the PINK1
626 kinase associates with the TOM complex and activates Parkin by phosphorylating the Ser65 residues of
627 Parkin and ubiquitin. By ubiquitylating targets on the outer mitochondrial membrane, possibly the
628 receptors TOM20 and/or TOM70, Parkin facilitates the import of proteins targeted to mitochondria by a

629 classical MTS and the TOM20 receptor. The mitochondrial ubiquitylase USP30 antagonizes the
630 PINK1/Parkin-dependent ubiquitylation and protein import facilitation. Mutations in *PARK2* or *PINK1*
631 impair the PINK1/Parkin system and its regulatory effect on mitochondrial protein import, contributing to
632 the pathophysiology of autosomal recessive PD.

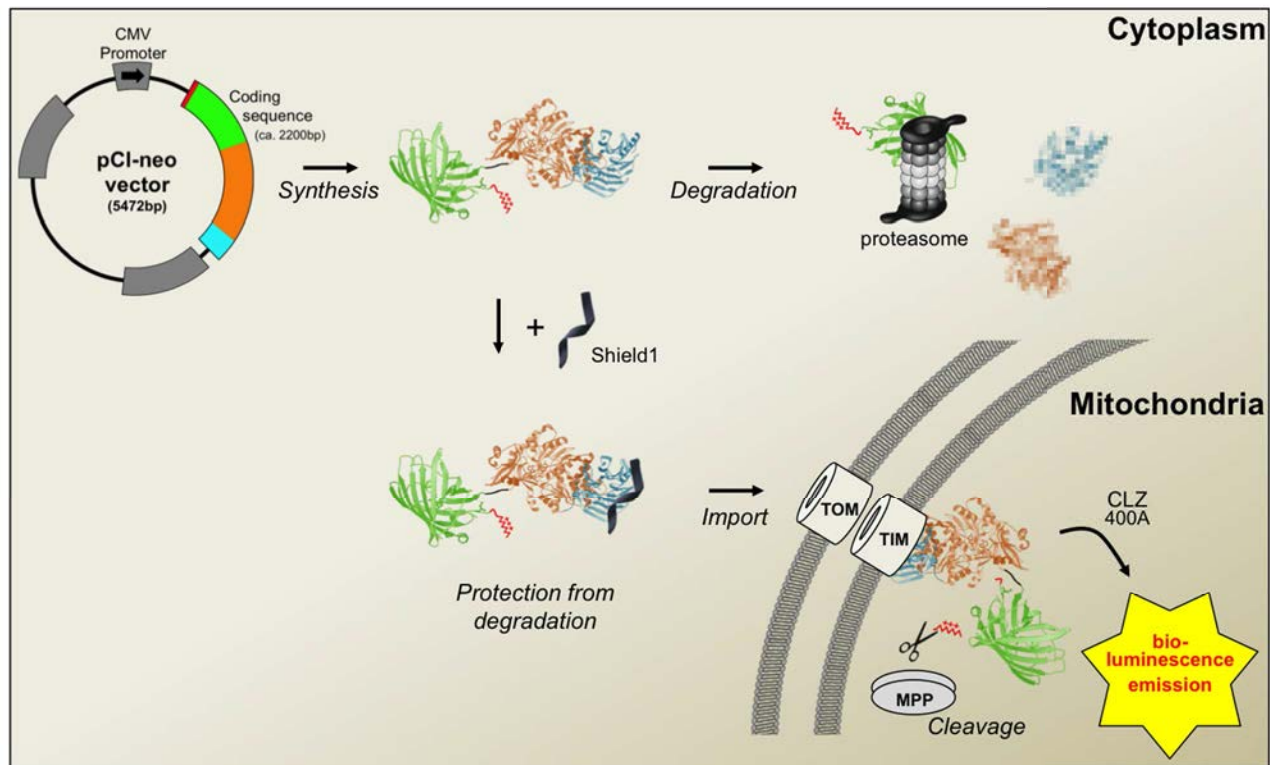
A



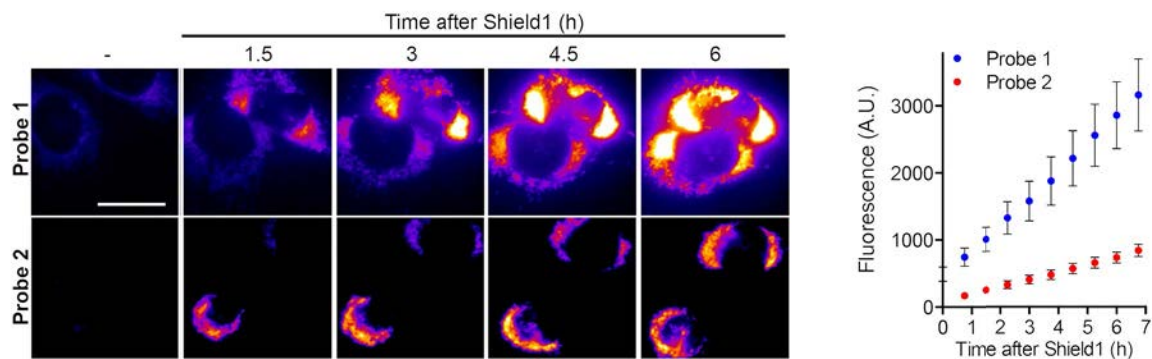
B



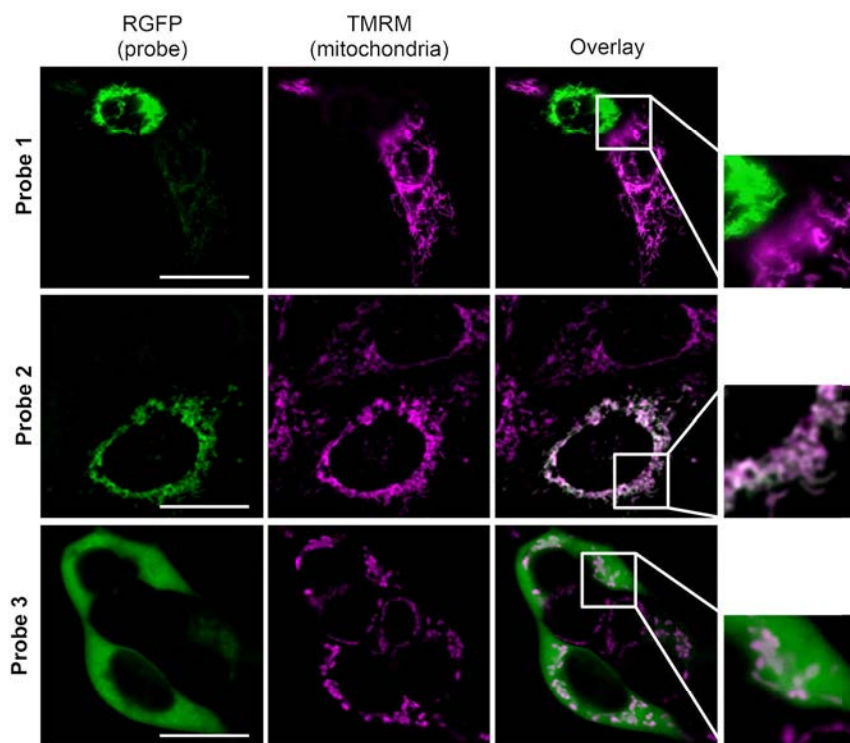
C



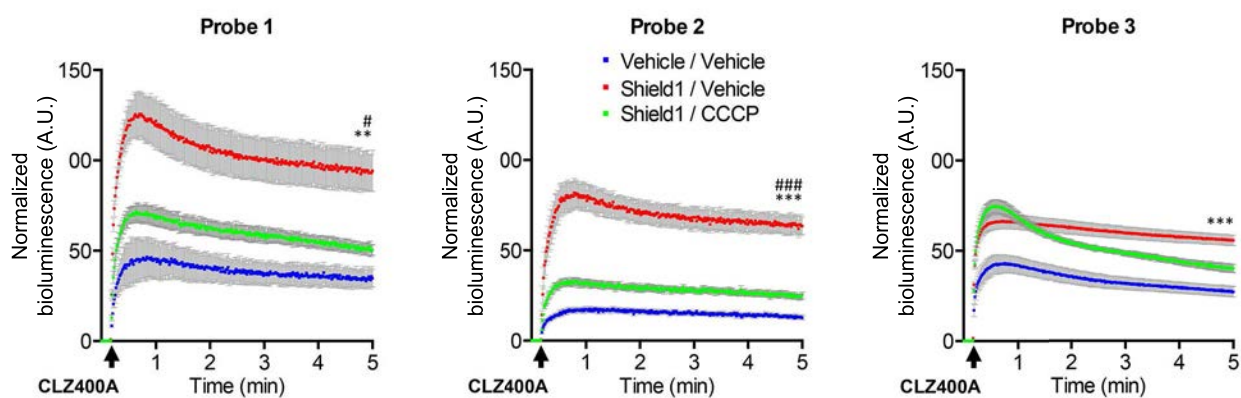
A



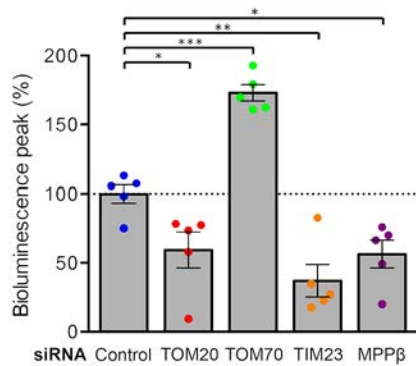
B



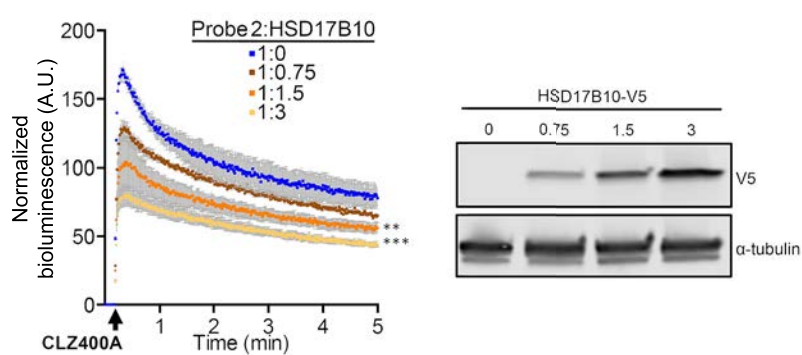
C

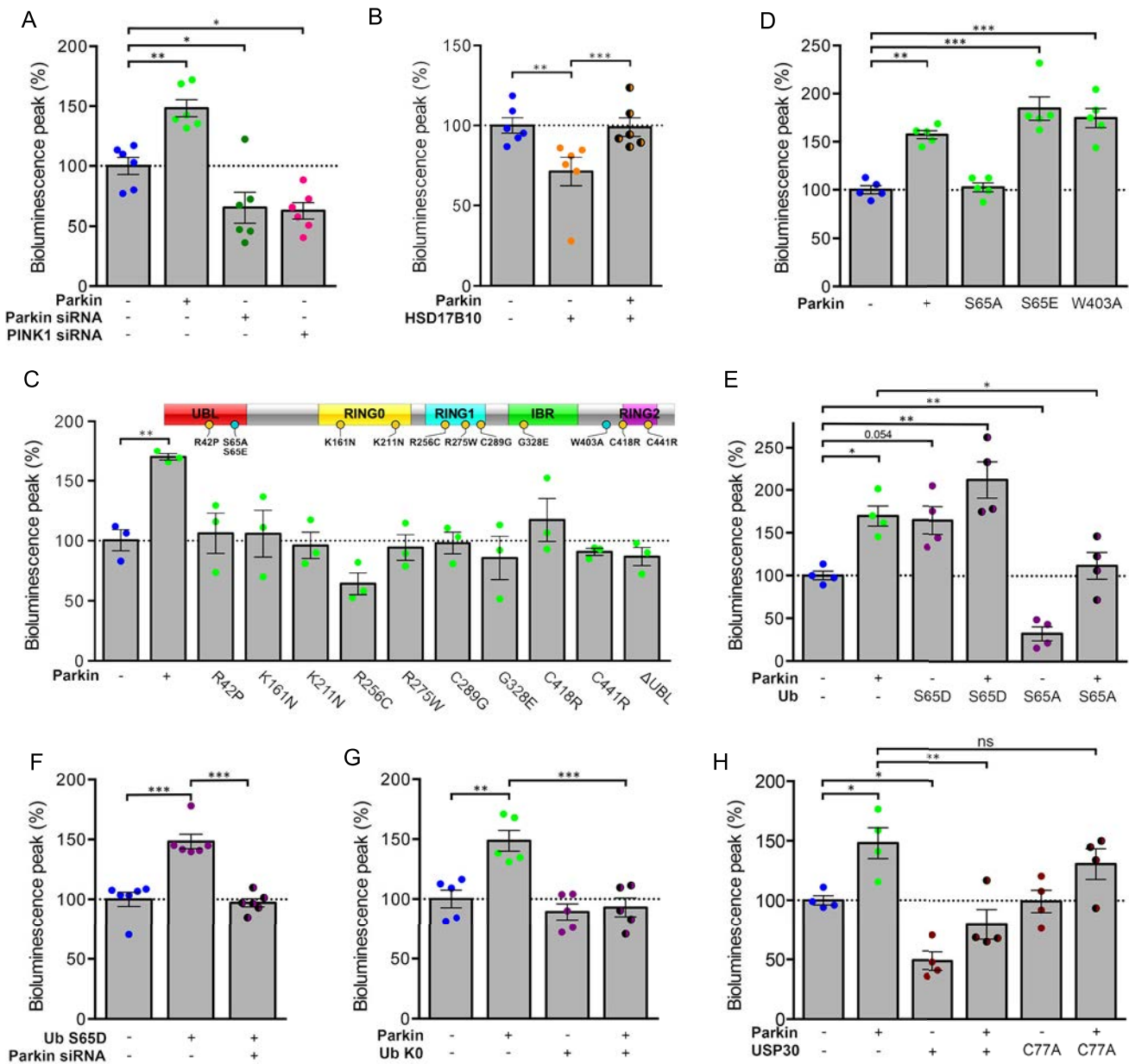


D

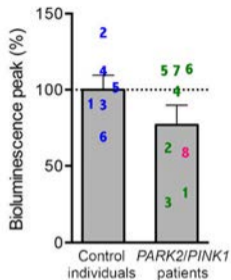


E

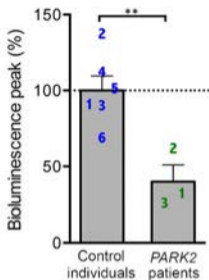




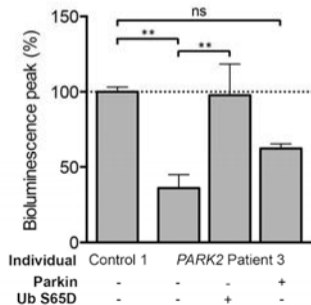
A



B



C

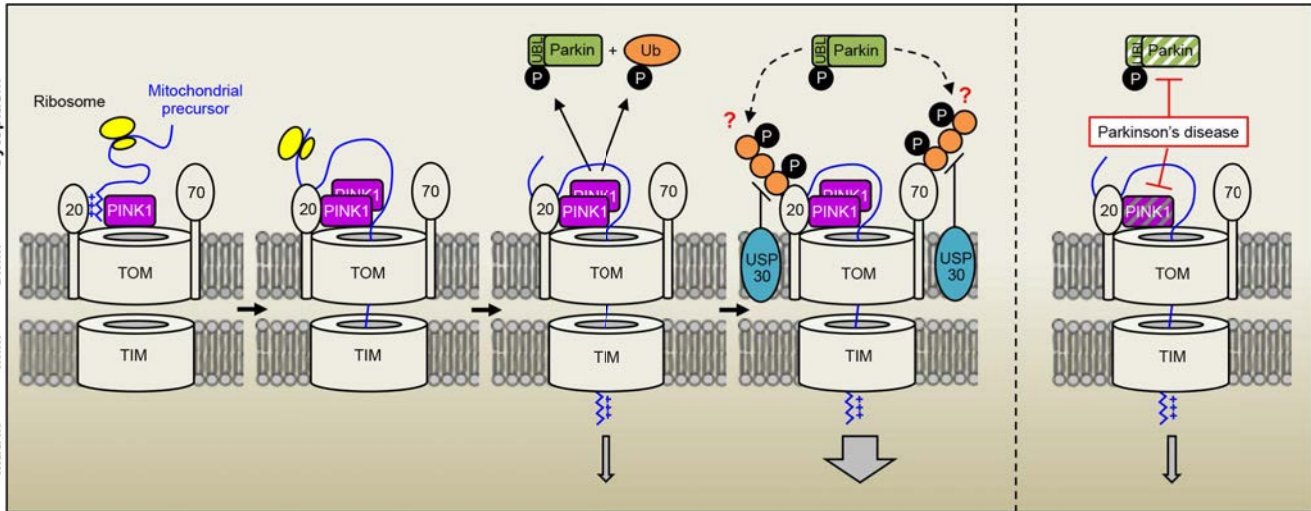


Cytoplasm

OMM

IMM

Matrix



1 **Supplementary Table 1** Characteristics of the donors of the primary skin fibroblasts used in the study

Individual	Age	Sex	Gene	Mutation(s)	Protein
Patient 1	46	F	<i>PARK2</i>	c.[(871+1_872-1)_(1083+1_1084-1)del];[125G>C]	p.[Ala291ValfsX8];[Arg42Pro]
Patient 2	40	F	<i>PARK2</i>	c.[(871+1_872-1)_(1083+1_1084-1)del];[125G>C]	p.[Ala291ValfsX8];[Arg42Pro]
Patient 3	51	F	<i>PARK2</i>	c.[(871+1_872-1)_(1083+1_1084-1)del];[125G>C]	p.[Ala291ValfsX8];[Arg42Pro]
Patient 4	50	M	<i>PARK2</i>	c.[(534+1_535-1)_(618+1_619-1)del];[1321T>C]	p.[Gly179_Ala206del];[Cys441Arg]
Patient 5	45	F	<i>PARK2</i>	c.[(412+1_413-1)_(534+1_535-1)del];[155delA]	p.[Ala138GlyfsX7];[Asn52MetfsX29]
Patient 6	37	F	<i>PARK2</i>	c.[(171+1_172-1)_(734+1_735-1)del];[171+1_172-1_534+1_535-1)del]	p.[Asn58GlyfsX29];[Asn58_Gln178del]
Patient 7	65	M	<i>PARK2</i>	c.[(7+1_8-1)_(171+1_7172-1)del];[101_102delAG]	p.[Val3GlyfsX3];[Gln34ArgfsX5]
Patient 8	53	F	<i>PINK1</i>	c.[1366C>T];[1366C>T]	p.[Gln456*];[Gln456*]
Control 1	53	M	-	No mutation	Normal
Control 2	32	F	-	No mutation	Normal
Control 3	54	M	-	No mutation	Normal
Control 4	65	F	-	No mutation	Normal
Control 5	64	F	-	No mutation	Normal
Control 6	52	M	-	No mutation	Normal

3 **Supplementary Table 2** Antibodies used for western blotting

Primary antibodies			
Type	Company	Catalog #	Host
c-Myc	Santa Cruz	sc-40	Mouse
α -tubulin	Abcam	ab7291	Mouse
α -tubulin	Abcam	ab18251	Rabbit
MPP β	Proteintech	16064-1-AP	Rabbit
TOM20	Abcam	ab56783	Mouse
TOM70	Abcam	ab106193	Mouse
Parkin	Millipore	mab5512	Mouse
Flag	Sigma	F1804	Mouse
V5	Abcam	Ab27671	Mouse
TIM23	BD Biosciences	611223	Mouse
Mfn2	abcam	ab50838	Rabbit
Total OxPhos	Invitrogen	458099	Mouse
Ubiquitin	Santa Cruz	sc-8017	Mouse
HSD17B10	abcam	ab10260	Mouse
Secondary antibodies			
IRDye 800CW-conjugated anti-mouse/rabbit	Li-Cor	926-32211/926-32210	Goat
IRDye 680RD-conjugated anti-mouse/rabbit	Li-Cor	26-68071/926-68070	Goat
Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse/rabbit	Jackson ImmunoResearch	115-035-146/111-035-144	Goat

5 **Supplementary Table 3** Sequence of primers used for quantitative RT-PCR analysis

Gene	RT-PCR forward primers	RT-PCR reverse primers
<i>PARK2</i>	5'-CGCAACAAATAGTCGGAAC-3'	5'-GAGGGTCGTGAACAAACTG-3'
<i>PINK1</i>	5'-GCAGTACCAAGAGGCTCAG-3'	5'-CACCCAGAGGCTTAGATGA-3'
<i>ACTB</i>	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

6

7 **Supplementary figure legends**

8

9 **Supplementary Figure 1** Validation of Probe 2 in HEK293T cells. (A) Western blot analyses of total cell
10 fractions, illustrating the downregulation of molecular components of mitochondrial import pathways by specific
11 siRNAs. (B) Silencing of TOM20, TOM70, TIM23 and MPP does not affect the abundance of other markers of
12 mitochondrial subcompartments (Mfn2: mitochondrial outer membrane, ATP5a1: mitochondrial inner membrane,
13 HSD17B10: mitochondrial matrix). Loading control: α -tubulin. Representative western blots and corresponding
14 quantifications, illustrating (C) the localization of Probe 2 in trypsin-digested mitochondrion-enriched fractions
15 from cells treated with Shield1 and the absence of a signal following CCCP treatment; and (D) stabilization of the
16 probe by Shield1 and proteasome inhibition (MG132) in total cell fractions. Loading controls: α -subunit of MPP
17 (MPP) and α -tubulin. Results are expressed as means \pm SEM, with $n = 3$ independent experiments. Data were
18 analyzed by one-way (B) or two-way ANOVA (C,D) with Dunnet's (B,D) or Holm-Sidak's (C) post-hoc tests.
19 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

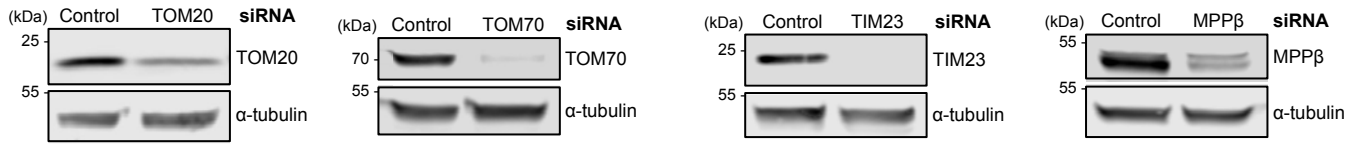
20 **Supplementary Figure 2** Parkin modulates the mitochondrial presequence import pathway in HEK293T cells.
21 (A) Efficiency of *PARK2* and *PINK1* silencing with specific siRNAs, as shown by quantitative RT-PCR. $n = 3$
22 independent experiments. (C) BRET signal of Probe 2 in control cells or cells coproducing Parkin, normalized
23 against probe fluorescence (left graph) or MitoTracker Deep Red staining intensity (right graph). (C-K) Western
24 blot analyses of total cell fractions, illustrating the overproduction of each protein of interest in the experiments
25 presented in Fig. 3; (K) illustrates the relative levels of USP30-Flag and USP30 C77S-Flag. Loading control: α -
26 tubulin. Results are expressed as means \pm SEM. Data were analyzed with Student's *t* test (A) or two-way
27 repeated-measures ANOVA with Dunnet's post-hoc test (B). $*p < 0.05$, $***p < 0.001$.

28 **Supplementary Figure 3** Validation of Probe 1 in human primary fibroblasts (Control 1). (A) Quantitative analysis
29 of BRET signals in cells with and without Shield1 and/or CCCP (24 h) treatment, following the addition of
30 CLZ400A. $n = 8$ wells from one representative experiment. (B) Representative fluorescence images and higher
31 magnifications (framed regions in the overlay) showing the colocalization of Probe 1 (RGFP signal) and TMRM
32 signals in living cells treated for 24 h with Shield in fibroblasts from a control individual (Control 1) and a *PARK2*

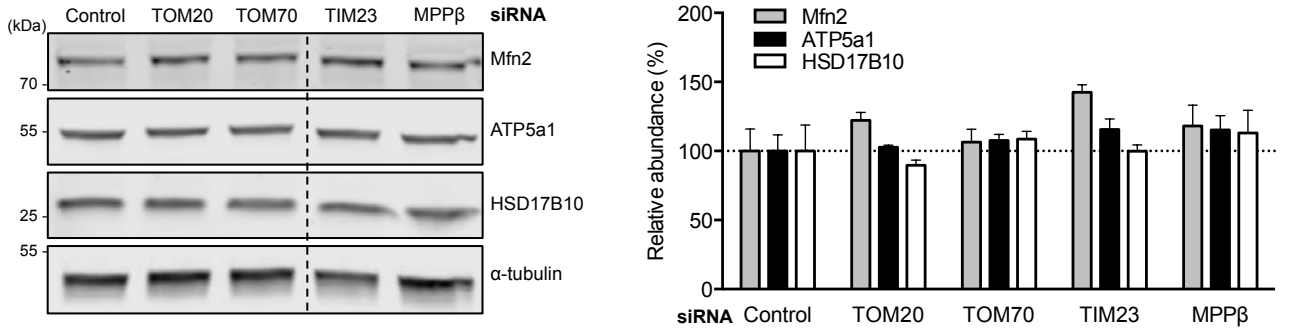
- 33 patient (Patient 3). Scale bar: 10 μm . Results are expressed as means \pm SEM. ** $p < 0.01$ versus vehicle/vehicle;
- 34 ## $p < 0.01$ versus Shield1/CCCP (A, two-way repeated-measures ANOVA with Tukey's post-hoc test).

Figure S1

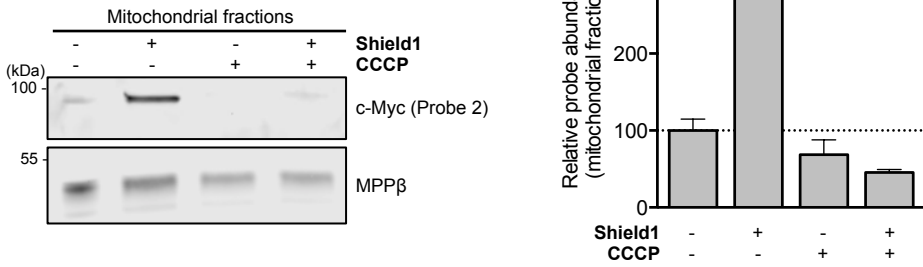
A



B



C



D

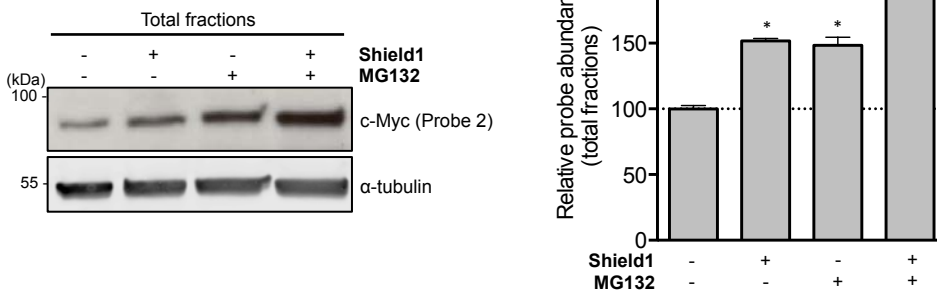
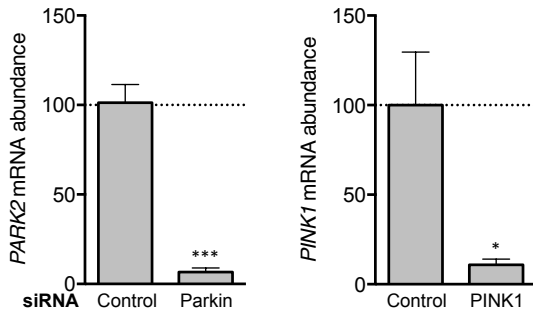
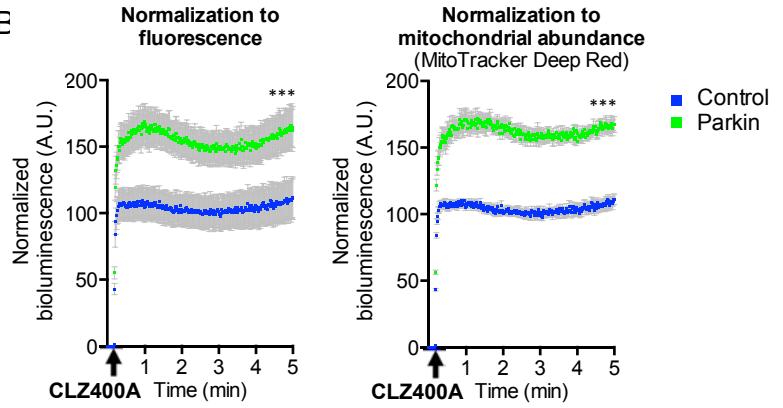


Figure S2

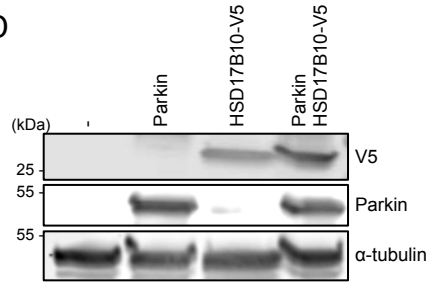
A



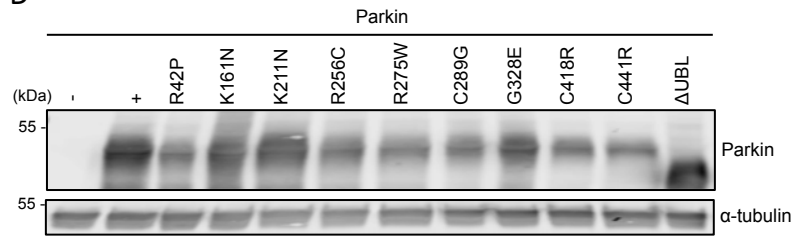
E



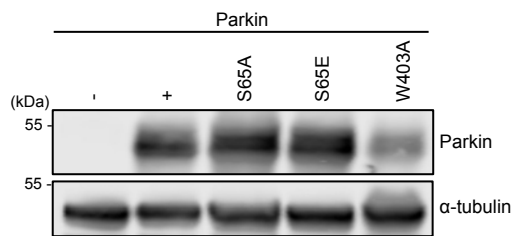
D



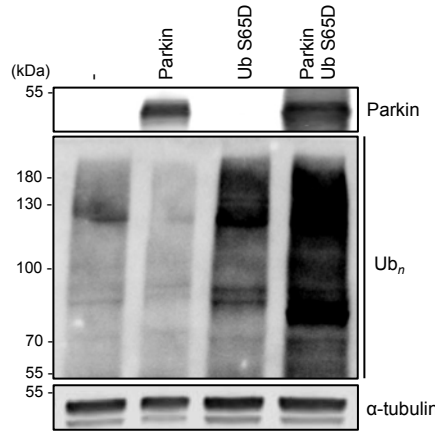
D



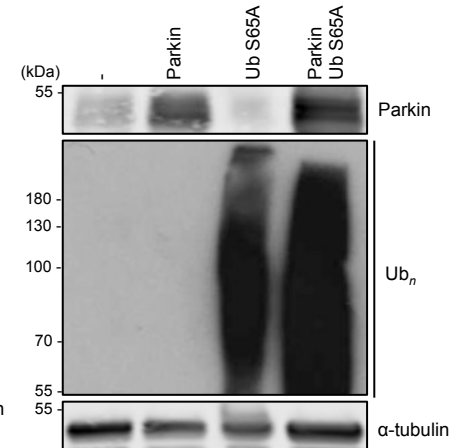
E



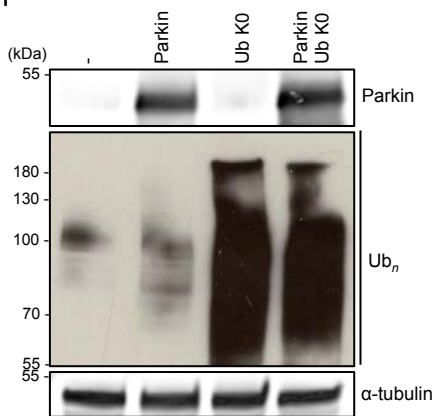
F



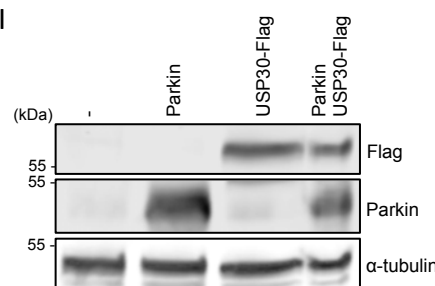
G



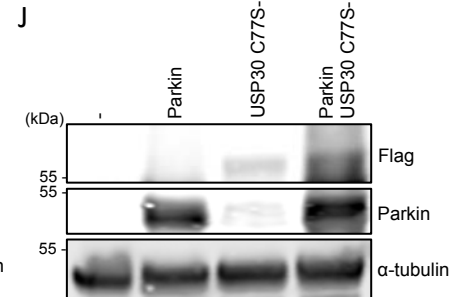
H



I



J



K

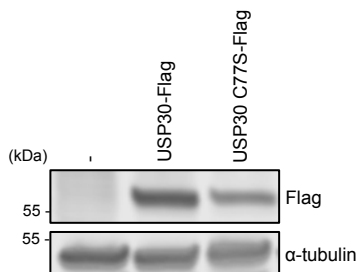
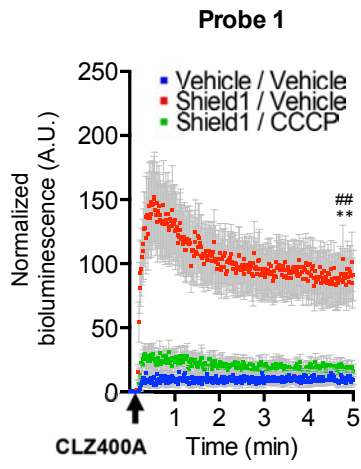
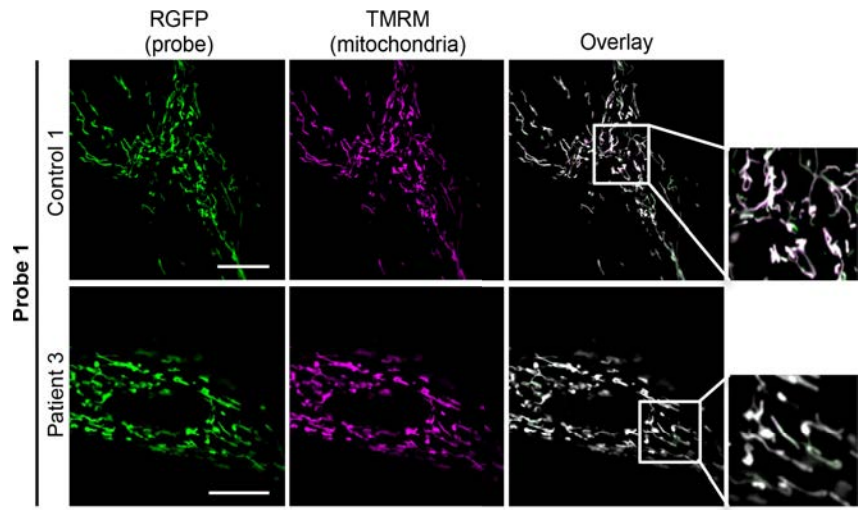


Figure S3

A



B



II.1 VPS13C : un nouveau gène impliqué dans les formes autosomiques récessives, dont la perte de fonction affecte la mitochondrie

Article 4 : Loss of VPS13C fonction in autosomal-recessive parkinsonism causes mitochondrial dysfunction and increases PINK1/Parkin-dependent mitophagy (Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):500-13)

Dans le cadre d'une grande étude collaborative impliquant le consortium international IPDGC (*International Parkinson Disease Genomics Consortium*) notre équipe a récemment identifié un nouveau gène dont les mutations sont à l'origine de formes autosomiques récessives de la maladie de Parkinson : *VPS13C* (*vacuolar protein sorting 13 homolog C*). Des mutations hétérozygotes composites de ce gène ont été retrouvées chez trois individus appartenant à des familles distinctes avec des phénotypes très comparables (syndrome akinéto-rigide, associé à une bonne réponse à la L-Dopa et à une dégénérescence rapide et agressive). L'implication de ce type de protéine dans le trafic vésiculaire a déjà été mise en évidence suggérant l'implication possible de Vps13C dans ce processus [Dhungel *et al.*, 2015]. Cependant, nous montrons dans cette étude que Vps13C est également retrouvée dans des fractions mitochondriales lors d'un fractionnement par gradient de sucrose ; nous nous sommes alors posés la question de savoir si elle pouvait être reliée aux fonctions de la voie PINK1/Parkine.

Au cours de cette étude, j'ai démontré que la perte de fonction de Vps13C dans des cellules de mammifère a un impact majeur sur la physiologie mitochondriale. Elle conduit en effet à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial et de la complexité du réseau mitochondrial, ainsi qu'à une augmentation de la respiration de ces organites.

Egalement, lors d'un stress mitochondrial engendré par un traitement au CCCP, la perte de fonction de Vps13C est à l'origine d'une accumulation anormale

de PINK1 au niveau mitochondrial, induisant un recrutement massif de la Parkine et *in fine*, à une augmentation de la mitophagie.

En conclusion, ce papier identifie pour la première fois la protéine Vps13C comme une protéine essentielle à la physiologie mitochondriale, où l'activation de la voie PINK1/Parkine mise en évidence lors de son absence pourrait être la cause d'une altération mitochondriale due à une baisse $\Delta\Psi^{\text{mit}}$. Nous ne pouvons cependant pas exclure un éventuel rôle de régulateur négatif de Vps13C dans la voie PINK1/Parkine. Ces résultats préliminaires restent cependant à confirmer en développant des modèles animaux, ce qui permettraient de disséquer les mécanismes par lesquels la perte de fonction de *VPS13C* affecterait la physiologie mitochondriale et potentiellement la survie des neurones dopaminergiques.

Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy

Suzanne Lesage,^{1,2,3,4,25} Valérie Drouet,^{1,2,3,4,25} Elisa Majounie,^{5,25} Vincent Deramecourt,⁶ Maxime Jacoupy,^{1,2,3,4} Aude Nicolas,^{1,2,3,4} Florence Cormier-Dequaire,^{1,2,3,4,7} Sidi Mohamed Hassoun,^{1,2,3,4} Claire Pujol,^{1,2,3,4} Sorana Ciura,^{1,2,3,4} Zoi Erpapazoglou,^{1,2,3,4} Tatiana Usenko,^{1,2,3,4} Claude-Alain Maurage,⁶ Mourad Sahbatou,⁸ Stefan Liebau,⁹ Jinhui Ding,⁵ Basar Bilgic,¹⁰ Murat Emre,¹⁰ Nihan Erginel-Unaltuna,¹¹ Gamze Guven,¹¹ François Tison,¹² Christine Tranchant,¹³ Marie Vidailhet,^{1,2,3,4,14} Jean-Christophe Corvol,^{1,2,3,4,7} Paul Krack,¹⁵ Anne-Louise Leutenegger,^{16,17} Michael A. Nalls,⁵ Dena G. Hernandez,⁵ Peter Heutink,¹⁸ J. Raphael Gibbs,⁵ John Hardy,¹⁹ Nicholas W. Wood,¹⁹ Thomas Gasser,¹⁸ Alexandra Durr,^{1,2,3,4,20} Jean-François Deleuze,²¹ Meriem Tazir,²² Alain Destée,²³ Ebba Lohmann,^{10,24} Edor Kabashi,^{1,2,3,4} Andrew Singleton,⁵ Olga Corti,^{1,2,3,4,*} Alexis Brice,^{1,2,3,4,20,*} French Parkinson's Disease Genetics Study (PDG), and the International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC)

Autosomal-recessive early-onset parkinsonism is clinically and genetically heterogeneous. The genetic causes of approximately 50% of autosomal-recessive early-onset forms of Parkinson disease (PD) remain to be elucidated. Homozygosity mapping and exome sequencing in 62 isolated individuals with early-onset parkinsonism and confirmed consanguinity followed by data mining in the exomes of 1,348 PD-affected individuals identified, in three isolated subjects, homozygous or compound heterozygous truncating mutations in *vacuolar protein sorting 13C* (*VPS13C*). *VPS13C* mutations are associated with a distinct form of early-onset parkinsonism characterized by rapid and severe disease progression and early cognitive decline; the pathological features were striking and reminiscent of diffuse Lewy body disease. In cell models, *VPS13C* partly localized to the outer membrane of mitochondria. Silencing of *VPS13C* was associated with lower mitochondrial membrane potential, mitochondrial fragmentation, increased respiration rates, exacerbated PINK1/Parkin-dependent mitophagy, and transcriptional upregulation of *PARK2* in response to mitochondrial damage. This work suggests that loss of function of *VPS13C* is a cause of autosomal-recessive early-onset parkinsonism with a distinctive phenotype of rapid and severe progression.

Introduction

Parkinson disease (PD [MIM: 168600]) is a motor syndrome with variable combinations of akinesia, rigidity, and rest tremor responding to levodopa. It is caused by degeneration of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and is associated with Lewy bodies, intraneuronal inclusions enriched in α -synuclein. In recent years, our understanding of the pathophysiological mechanisms underlying molecular defects in familial forms of PD has greatly advanced. Three genes have been

conclusively associated with autosomal-dominant (AD) forms of PD (*SNCA* [MIM: 163890], *LRRK2* [MIM: 609007], and *VPS35* [MIM: 601501]) and eight genes (*PARK2* [MIM: 602544], *PINK1* [MIM: 608309], *DJ-1* [MIM: 602533], *ATP13A2* [MIM: 610513], *FBXO7* [MIM: 605648], *PLA2G6* [MIM: 603604], *SYNJ1* [MIM: 604297], and *DNAJC6* [MIM: 608375]) with early-onset (EO) autosomal-recessive (AR) forms.¹ EO AR parkinsonism is clinically and genetically heterogeneous: mutations in *PARK2*, *PINK1*, and *DJ-1* cause phenotypes similar to idiopathic PD with good and prolonged response to dopaminergic

¹Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6 UMR S 1127, 75013 Paris, France; ²Inserm U 1127, 75013 Paris, France; ³CNRS UMR 7225, 75013 Paris, France; ⁴Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, 75013 Paris, France; ⁵Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging, NIH, Bethesda, MD 20892, USA; ⁶Department of Histology and Pathology, University of Lille Nord de France, Lille University Hospital, 59000 Lille, France; ⁷Centre d'Investigation Clinique Pitié Neurosciences CIC-1422, 75013 Paris, France; ⁸Fondation Jean Dausset-CEPH, 75010 Paris, France; ⁹Institute of Neuroanatomy, Eberhard Karls University Tübingen, 72074 Tübingen, Germany; ¹⁰Behavioural Neurology and Movement Disorders Unit, Department of Neurology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University, 34390 Istanbul, Turkey; ¹¹Department of Genetics, Institute for Experimental Medicine, Istanbul University, 34390 Istanbul, Turkey; ¹²Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux et CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France; ¹³Pôle Tête-Cou-CETD, Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires, 67000 Strasbourg, France; ¹⁴Pôle des Maladies du Système Nerveux, Fédération de Neurologie, Hôpital de la Salpêtrière, 75013 Paris, France; ¹⁵Neurology Department, CHU de Grenoble, Joseph Fourier University, and INSERM U836, 38000 Grenoble, France; ¹⁶Inserm U946, 75010 Paris, France; ¹⁷Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, UMR946, 75010 Paris, France; ¹⁸Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen and DZNE, German Center for Neurodegenerative Diseases, 72074 Tübingen, Germany; ¹⁹Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London WC1N 3BG, UK; ²⁰Department of Genetics and Cytogenetics, AP-HP, Hôpital de la Salpêtrière, 75013 Paris, France; ²¹Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut Génomique, Centre National de Génotypage, 91000 Evry, France; ²²Service de Neurologie CHU Mustapha, 16000 Alger, Algérie; ²³Movement Disorders Unit, Lille University, Inserm U837, Lille University Hospital, 59000 Lille, France; ²⁴Department of Neurodegenerative Diseases, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, and DZNE, German Center for Neurodegenerative Diseases, 72076 Tübingen, Germany

²⁵These authors contributed equally to this work

*Correspondence: olga.corti@upmc.fr (O.C.), alexis.brice@upmc.fr (A.B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.014>. ©2016 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

therapy. Other EO AR PD-associated genes cause more severe disease, a poor response to levodopa, and additional clinical signs, such as dystonia and cognitive impairment.¹ Mutations in *PARK2* and *PINK1* are the most common cause of EO AR PD, accounting for ~50% and 4% of familial cases in Europe, respectively.^{2,3} A significant proportion of cases remain genetically unexplained.

EO AR PD is linked to mitochondrial dysfunction. The mitochondrial kinase *PINK1* and the E3 ubiquitin-protein ligase *Parkin* cooperate in mitochondrial quality control.⁴ They promote the removal of dysfunctional mitochondria in a process termed mitophagy that might also involve *FBXO7*.^{4,5} In addition, they play a role in a vesicular trafficking pathway targeting damaged mitochondrial components to the lysosome.⁶ To identify additional PD-associated genes involved in AR EO parkinsonism, we performed homozygosity mapping and exome sequencing in consanguineous PD families and isolated individuals and used data mining in the exomes of 1,348 unrelated PD-affected individuals. Five truncating mutations in *vacuolar protein sorting 13C (VPS13C)* [MIM: 608879] were identified in three unrelated PD-affected isolated individuals. We provide evidence that depletion of *VPS13C* exacerbates mitochondrial vulnerability to stress.

Subjects and Methods

Participants

Gene Discovery Cohort

We selected nine PD-affected families (with two or more affected siblings) and 43 unrelated isolated individuals according to the following criteria: (1) diagnosed by neurologists according to the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank (PDSBB) clinical diagnostic criteria⁷ and onset ≤ 55 years in at least one affected family member; (2) with no mutations in known PD-associated genes; and (3) with confirmed consanguinity (inbreeding coefficient $F \neq 0$ computed with the FEstim program⁸). Sixteen families or isolated subjects were European, 16 North African, 19 Turkish, and 1 Lebanese. A total of 66 PD-affected individuals (23 family members and 43 isolated subjects) and 39 unaffected relatives were included for the genome-wide screen study. 62 affected and 10 unaffected individuals were subsequently selected for whole-exome sequencing.

Validation Cohort

Exome data were obtained from a series of 1,348 additional PD-affected individuals (99% unrelated, 99% of European ancestry, 60% males, mean age at onset 41.7 ± 11.0 years), including 249 French PD-affected probands (57% males, age at onset ≤ 40 years, 50 individuals with atypical forms of parkinsonism) recruited by the French network for the study of PD genetics (PDG) and 530 matched control subjects (95% of European ancestry, 65% males, mean age at examination: 45.1 ± 10.7 years) from the International Parkinson Disease Genomics Consortium (IPDGC).

100 Turkish control subjects without family history of PD (43% males; mean age at examination, 60.4 ± 13.9 years) served to check for the absence of the identified variant in family A, which originated from Turkey.

A flow diagram detailing the selection criteria of PD-affected individuals and control subjects and the different experimental steps of the study is provided (Figure S1).

Study Approval

Informed consent was obtained from all participants, and the genetic studies were approved by local ethics committees (INSERM, CCPPRB du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France).

Neuropathological Assessment

The autopsy of the affected individual II-1 in family B (Figure 1) was performed approximately 36 hr post mortem. Brain tissues were fixed for 6 weeks in 10% buffered formalin, extensively sampled, and processed as previously described.⁹ Immunohistochemistry was performed by a Ventana Benchmark automate. We used hematoxylin-eosin staining for histopathology. For immunohistochemistry, the antibodies used were: anti-Tau (in-house AD2,¹⁰ 1 ng/mL), anti- β -amyloid (4G8, 1:1,000, Sigma), anti- α -synuclein (LB509, 1:500, Abcam), anti-ubiquitin (1:1,000, Dako), anti-TDP-43 (1:500, Protein Tech), and anti-gial fibrillary acid protein (GFAP, 1:20,000, Dako). The degree of neuronal loss and the frequency of α -synuclein-immunoreactive and other inclusions were determined semiquantitatively by visual inspection, in comparison to brains of three age-matched controls (two males and one female) from the Lille Neurobank collection.

Molecular Studies

Whole-Genome Homozygosity Linkage Mapping

Genome-wide screens were performed on all available affected ($n = 66$) and unaffected ($n = 39$) individuals from the gene discovery cohort using the Illumina HumanCytoSNP-12 v2.1 DNA Analysis BeadChip microarrays that contain ~300,000 SNPs and ~1,300 markers of common copy-number variations (CNVs). Homozygosity tracks (>2 Mb) were visualized with the Homozygosity Detector module and CNV with the Illumina cnvPartition module. The inbreeding coefficients F were computed with the FEstim program.⁸ Samples from individuals with confirmed consanguinity ($F \neq 0$) were subjected to exome sequencing.

Whole-Exome Sequencing

Exons from 62 affected (19 relatives and 43 isolated individuals) and 10 unaffected family members from the gene discovery cohort and all the 1,348 affected and 530 control individuals from the validation cohort were captured using different exome enrichment kits from fragmented genomic DNA and sequenced as indicated in Table S1. 10-fold mean sequencing depth was achieved in 96.4% and 88.8% of baited regions in PD-affected individuals and control subjects, respectively, and 30-fold mean sequencing depth was achieved across ~75% of targeted regions.

Human reference sequence UCSC hg19 was used for sequence alignment and variant calling with the Burrows-Wheeler Aligner¹¹ and the Genome Analysis Toolkit.¹² PCR duplicates were removed prior to variant calling using Picard software. Variants were annotated with ANNOVAR software¹³ (exomes from validation cohort) or SnpEff and SnpSift programs (exomes from gene discovery cohort). Data were analyzed with Ingenuity Variant Analysis (IVA) TM software from Ingenuity System. Effects on mRNA splicing by putative splice variants (± 5 base pairs around splice junctions according to IVA threshold) were analyzed with Splice Site Finder, MaxEntScan, NNsplice, Geneslicer, and Human Splicing Finder,¹⁴⁻¹⁶ all included in Alamut v.3 software. The human *VPS13C* protein and its closest homologs were aligned with Alamut v.3 software, computed by Ensembl, and aligned with MUSCLE.

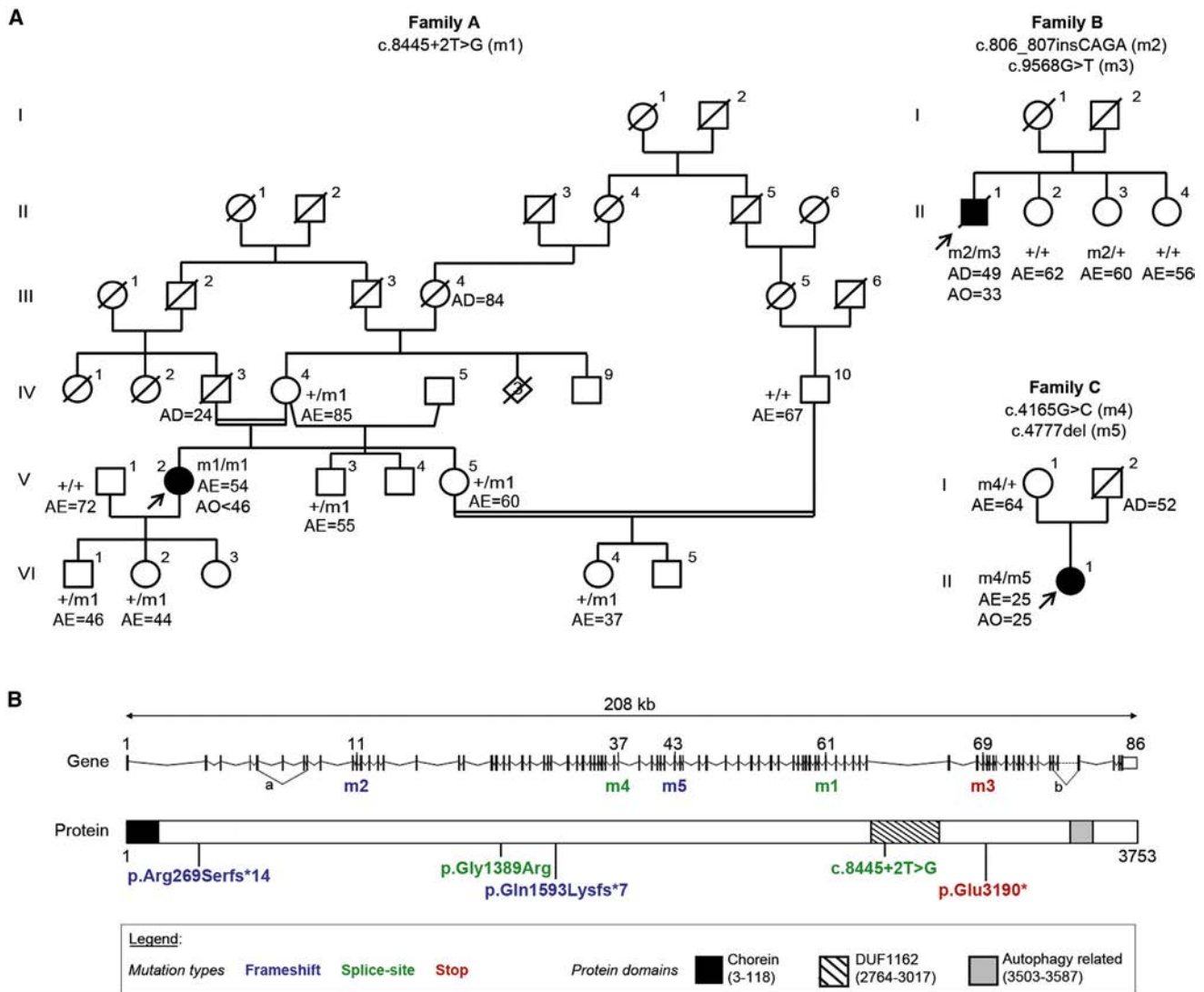


Figure 1. Identification of *VPS13C* Mutations

(A) Pedigrees of families with *VPS13C* mutations. Black symbols represent individuals with PD, open symbols, those unaffected. Arrows point to probands who underwent whole-exome sequencing. Abbreviations are as follows: AE, age at examination; AD, age at death; AO, age at onset.

(B) Schematic representation of *VPS13C* and its variations. *VPS13C* spans 208 kb and contains 86 exons encoding a 3,753-amino acid protein with a chorein domain at its N terminus, a DUF1162 domain of unknown function, and a putative autophagy-related domain. The five variations found in the three probands are indicated. Numbers above the gene identify the exons containing *VPS13C* variations. Alternative splicing a and b represent skipping of exons 6+7 and of exon 82, respectively. Transcripts 1A, GenBank: NM_017684.4: splicing a + b; 2A, GenBank: NM_020821.2: splicing b; 1B, GenBank: NM_018080.3: ends at exon 82; 2B, GenBank: NM_001018088.2: splicing a and ends at exon 82.

An in-house pipeline crossed the output data from IVA and Homozygosity Mapping to filter and identify the variants of interest (Figure S2). These variants were visualized with the Broad Institute Integrative Genomics Viewer (IGV) and verified by bidirectional Sanger sequencing using primers designed with Primer3 (Table S2) on an ABI 3730 automated sequencer (Life Technologies). Sanger sequencing confirmed the absence of mutations in origin-matched controls and determined the genetic status of unaffected relatives. Mutation nomenclature follows Human Genome Variation Society (HGVS) recommendations: the longest *VPS13C* transcript 2A cDNA nucleotides ("c.") are numbered from the adenine of the first ATG translation initiation codon as nucleotide +1 (reference sequence GenBank: NM_020821.2).

Splicing Defect Analysis by RT-PCR

Keratinocytes from affected individual V-2 in family A or peripheral blood lymphocytes from affected individual II-1 in family C (Figure 1) were used for splicing defects analyses. Hair follicles were plucked under sterile conditions and cultured in flasks coated with MG (1:10, Corning). Keratinocytes were grown on 20 mg/mL collagen IV (Sigma-Aldrich)-coated dishes containing EpiLife medium with the HKGS supplement (Life Technologies). Total RNA extraction was carried out with the RNeasy Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's manual. RNA (250 ng) was reverse transcribed into cDNA using iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad). Primers are listed in Table S2. RT-PCR products were Sanger sequenced

directly or after sub-cloning into the pJET1.2/blunt vector (Thermo Scientific).

Studies in Mammalian Cells

Mammalian Expression Vectors, siRNAs, Cell Culture, and Transfection COS-7 and HEK293T cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium + Glutamax (Life Technologies) supplemented with 10% goat serum (Life Technologies) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies). Cells were plated, at 80% confluence, on glass coverslips (Thermo Scientific) in 24-well cell plates for immunofluorescence, 6-well plates for qPCR, 10-cm Petri dishes for subcellular fractionation by differential centrifugation and for the mitochondrion isolation kit, or 75-cm² flasks for continuous sucrose gradient and Percoll gradient purification. Cells were co-transfected with siRNAs (15 to 30 nM) and expression vectors using Lipofectamine 2000 (Life Technologies), in an antibiotic-free medium, according to the manufacturer's instructions. The siRNA used were: Hs_VPS13C_5 and Hs_VPS13C_6 (siVPS13C, QIAGEN); PINK1 stealth siRNAs (siPINK1, Invitrogen); and AllStars negative control siRNA (siControl, QIAGEN). Their efficacy was controlled by quantitative real-time RT-PCR (Figure 5F). The expression vectors were: pcDNA3-HA-PARK2, pcDNA3-HA-PINK1, pcDNA3-HA,¹⁷ and pEGFP-C1 (Life Technologies). Where indicated, the cells were incubated with 10 μ M CCCP (Sigma).

Subcellular Fractionation, Trypsin Digestion Assay, and Western Blot Analyses

For sucrose density gradient, confluent HEK293T cells from five 75-cm² flasks were harvested and disrupted with a Dounce homogenizer (80 manual strokes) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 10% w/v sucrose, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), supplemented with protease and phosphatase inhibitors (0.2 mM sodium orthovanadate, 4 mg/mL sodium fluoride, 5.4 mg/mL β -glycerophosphate, and Complete cocktail 1X – 11836145001, Roche). After three centrifugations at 600 \times g for 5 min to remove cell debris, the cell lysate was layered on a 20%–60% linear sucrose gradient in Tris-HCl (pH 7.6) containing 10 mM EDTA, as previously described.¹⁸ After 18 hr of centrifugation at 100,000 \times g, successive 0.8 mL fractions were collected. Proteins were precipitated on ice with 10% trichloroacetic acid, pelleted by centrifugation at 13,000 \times g for 45 min, and resuspended in 100 μ L of loading buffer (Tris 60 mM [pH 6.8], SDS 4%, β -mercaptoethanol 5%, glycerol, and bromophenol blue).

Total protein fractions were obtained from cells lysed in 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Tris (pH 7.4), 0.2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.1% BSA, and protease and phosphatase inhibitors after centrifugation at 600 \times g for 5 min at room temperature. Mitochondrion-enriched fractions were obtained by differential centrifugation (HEK293T) or magnetic isolation (COS-7) and digested with trypsin (Sigma), as previously described.^{17,19}

For isolation of pure mitochondria, cells were lysed in 250 mM mannitol, 5 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM EGTA with protease, and phosphatase inhibitors and the crude mitochondrial fraction was layered on top of a 30% Percoll gradient, as previously described.²⁰ Protein concentrations were determined with Bio-Rad protein assays (Bio-Rad, 500-0006), based on the Bradford method. Samples were boiled in protein sample buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Protran, Whatman), and analyzed by Western blotting with selected primary and

secondary antibodies (Table S3). Membranes were incubated with enhanced chemiluminescence substrate (Pierce); chemiluminescent and fluorescent signals were revealed on film (ECL, Amersham Hyperfilm) or captured with Odyssey Imaging (LICOR) systems and quantified with ImageJ software (NIH). Total or cytoplasmic fractions were normalized to α -tubulin, mitochondrial fractions to PMPCB. Three to six independent fractionation experiments were quantified.

Analysis of Mitochondrial Respiration

Cellular oxygen consumption was measured via high-resolution respirometry (OROBOROS Oxygraph-2k) in a temperature-regulated chamber at 37°C. Oxygen consumption was measured in intact COS-7 cells at a density of 2.5 \times 10⁶ cells in 2 mL of respiration assay medium (1 \times DMEM, GlutaMAX, GIBCO) containing 4.5 g/L D-glucose and 4 mM L-glutamine, by sequential additions of 1 μ g/mL oligomycin, 2.5 μ M CCCP, and 5 μ M rotenone/10 μ M antimycin A. We determined the following mitochondrial parameters: basal oxygen consumption (= basal cellular respiration – non-mitochondrial respiration), proton leak (= oligomycin-inhibited respiration – non-mitochondrial respiration), maximal respiratory capacity (= maximal uncoupled respiration – non-mitochondrial respiration), reserve respiratory capacity (= maximal uncoupled respiration – basal respiration), and non-mitochondrial respiration (rotenone/antimycin A-inhibited respiration). Cells were then lysed to quantify the protein content using the Bradford reagent, which was used to normalize the oxygen consumption data. The results were expressed in pmol of O₂/s/mg of total protein.

Immunostaining, $\Delta\Psi_{mt}$, Respiration, Mitochondrial Morphology, and Parkin-Dependent Mitophagy

Immunocytochemical stainings were performed as described previously with the antibodies and dilution conditions indicated in Table S3. Changes in $\Delta\Psi_{mt}$ were evaluated with the potentiometric dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) as described.¹⁹ Mitochondrial morphology was analyzed on COS-7 cells immunostained for the Beta subunit of the mitochondrial processing peptidase (PMPCB) using an image-processing algorithm and two descriptive parameters to assess mitochondrial length and branching: aspect ratio, calculated as the ratio between major and minor axes of each mitochondrial object, representing its length; and form factor, calculated as perimeter²/(4 π \times area), representing a combined evaluation of the length and degree of branching of the mitochondrial network.^{21,22} For Parkin-dependent mitophagy, cells were immunostained for PMPCB or the outer mitochondrial membrane protein TOMM20 and quantified as described.¹⁷ Images were acquired with an Olympus FV-1000 confocal microscope (\times 60 oil immersion objective, NA 1.35) and analyzed with ImageJ analysis software (NIH).

Quantitative Real-Time RT-PCR

To demonstrate the efficiency of the siRNA-mediated silencing of endogenous VPS13C in HEK293T cells, total RNA was isolated from cells transfected with control or VPS13C or PINK1 siRNA using the RNeasy plus Mini Kit (QIAGEN) and QIAshredder (QIAGEN). RNA from each sample (500 ng) was reverse transcribed into cDNA using iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad). Real-time PCR was performed with the LightCycler 480 System (Roche Applied Science) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Results were analyzed with LightCycler 480 sw 1.5 quantification Software (Roche Applied Science). *Beta-actin* (ACTB) was used as the reference gene for normalization. Primers are listed in Table S2.

Statistical Analysis

Statistical significance was established at $p < 0.05$ and determined with an unpaired *t* test in Figures 4A (Aspect Ratio) and S6A; matched *t* test in Figures 4C, 5B, and 5D; Mann-Whitney-Wilcoxon test in Figure 4A (Form Factor); one-way ANOVA in Figures 6 and S5; or two-way ANOVA in Figures 4B, 5E, and 5F.

Results

Truncating Mutations in *VPS13C* Cause AR Parkinsonism

Genome-wide screens in an initial series of 66 affected and 39 unaffected subjects using DNA microarrays identified a mean of 16.3 regions of homozygosity ≥ 2 Mb on the 22 autosomes of each consanguineous individual (gene discovery cohort). No rare deleterious large genomic rearrangements were detected. Exomes were subsequently sequenced in the 62 affected individuals with confirmed consanguinity (inbreeding coefficient $F \neq 0$) and 10 unaffected family members to identify homozygous variants which: (1) in priority, would disrupt the protein function (frameshifts, stop codons, or splicing variants); (2) were rare (minor allele frequency [MAF] $< 1\%$) in dbSNP137, the National Heart Lung and Blood Institute (NHBLI), Exome Sequencing Project (ESP) database, and the 1000 Genomes Project; (3) were shared by affected siblings when available; (4) were heterozygous in parents and/or heterozygous or wild-type in unaffected siblings when available; (5) fell within homozygous intervals; and (6) were absent in the homozygous state from DNA of 530 controls. We identified rare or undescribed homozygous truncating variants within 32 genes, each found in a single affected individual with consanguinity that fulfilled all these prioritization criteria (Table S4). We screened these candidate genes for additional homozygous or compound heterozygous mutations in a validation cohort. *VPS13C* (also known as KIAA1421; GenBank: NM_020821.2) on chr15q22 was mutated in a consanguineous Turkish PD-affected individual (V-2 in family A) from the gene discovery cohort and in two additional French PD-affected isolated individuals (II.1 in family B and II.1 in family C) from the validation cohort (Figure 1A). In addition, we identified a total of 80 rare (MAF $< 1\%$ in public databases) single heterozygous mostly nonsynonymous variants in *VPS13C* from the validation cohort, including 14 present in at least one of the 530 European control subjects (Table S5). No additional homozygous or compound heterozygous variants were found in the 31 other candidate genes.

The affected individual V-2 in family A harbored a homozygous splice-site mutation c.8445+2T>G, intron 61 in *VPS13C* confirmed by Sanger sequencing; eight unaffected relatives, including the mother, had heterozygous c.8445+2T>G mutations or wild-type sequences (Figures 1A and S3A). Affected individuals in families B and C were compound heterozygotes (Figures 1A, S3B, and S3C): the affected individual II-1 in family B with c.[806_807insCAGA];[9568G>T], p.[Arg269Serfs*

14];[Glu3190*] variants; the affected individual II-1 in family C with c.[4165G>C];[4777delC], p.[Gly1389Arg];[Gln1593Lysfs*7] variants. Direct sequencing of *VPS13C* in the three unaffected siblings (II-2, II-3, and II-4) in family B and the unaffected mother (I-1) in family C showed that they all carried heterozygous mutations or wild-type alleles (Figures 1A and S3), indicating that all variations were located on different alleles. The five *VPS13C* variants were absent from dbSNP137, 1000 Genomes Project, EVS (Table S6A), Exome Aggregation Consortium (ExAC) databases (Table S6B), and our European control exomes, except for the missense p.Gly1389Arg variant found on one control chromosome. In addition, the c.8445+2T>G mutation was absent from 200 Turkish control chromosomes. No disruptive bi-allelic variants were found in our 530 control subjects; one disruptive homozygous variant (rs199602573) was found in the EVS database and ExAC populations (1/6,246 and 2/61,547, respectively), indicating that *VPS13C* homozygous disruptive variants are extremely rare in non-PD-affected populations (Tables S6 and S7).

The c.4165G>C and c.8445+2T>G mutations were predicted *in silico* to modify donor splice sites, one base upstream and two bases downstream, respectively, of splice junctions (Figure S4A). Reverse-transcription PCR analysis of potential splicing defects confirmed the predictions (Figure S4B). RNA from the homozygous individual of family A showed at least three shorter transcripts, lacking up to 231 nucleotides at the end of the exon 61. In the subject with the heterozygous variant, shorter transcripts were barely visible, probably due to a high instability of these aberrant RNAs. In family C, the longer transcript was found in the subject with the heterozygous variant, containing 14 additional nucleotides from intron 37.

VPS13C contains 86 exons spanning a 208-kb genomic region and has two main transcript variants, 1A (GenBank: NM_017684.4) and 2A (GenBank: NM_020821.2) (Figure 1B). Although the transcript 1A, lacking exons 6 and 7 and encoding a 3,710-amino acid protein, is expressed in most tissues, including brain and peripheral blood cells, the longest transcript 2A encodes a brain-specific 3,753-amino acid protein.²³ Two additional isoforms with uncharacterized expression pattern are reported in Ensembl (GenBank: NM_018080.3 and NM_001018088.2) and lack the last four exons. All the isoforms contain the splice site variants found in families A and C. *VPS13C* contains a chorein domain at its N terminus, a DUF1162 domain of unknown function, and a putative autophagy-related domain (Figure 1B). Except for the c.8445+2T>G variant, which is located in the DUF1162 domain, none of the variants were found in the predicted domains.

Clinical and Pathological Characteristics of Affected Individuals Harboring *VPS13C* Mutations

The three affected individuals harboring *VPS13C* mutations had early disease onset (25 to < 46 years) and typical parkinsonism (akineto-rigid syndrome, rest tremor, good

Table 1. Clinical Characteristics of Affected Individuals Harboring VPS13C Mutations

	V-2 from Family A	II-1 from Family B	II-1 from Family C
Origin	Turkish	French	French
Consanguinity	yes	no	no
Gender	female	male	female
Age at onset (years)	<46	33	25
Symptoms at onset	depression; asymmetric akineto rigid syndrome; no dystonia	asymmetric akineto rigid syndrome and rest tremor; limb dystonia	asymmetric akineto rigid syndrome; limb dystonia
Response to levodopa	yes, partial	yes, at early stage	yes, at early stage (evaluated at 75% initially)
Complications with treatment	no motor fluctuation nor dyskinesia	fluctuation and dyskinesia, ICD, somnolence	no motor fluctuation nor dyskinesia
Evolution	severe with early cognitive decline with spatial disorientation (MMSE 21), slurred speech and hallucinations at the age of 51; axial symptoms (postural instability, FOG, and falls) and dysautonomia with urinary incontinence at the age of 54; bedridden, unable to speak, apathetic, confused, cachexic with dysphagia at the age of 58	severe with early cognitive decline (MMSE 18 at the age of 40); axial symptoms (FOG at the age of 35, falls at the age of 39); dysautonomia (at the age of 35); bedridden at the age of 43, death at the age of 49 of aspiration pneumonia	severe with early cognitive decline, slurred speech before the age of 39; severe axial symptoms at early stage; bedridden at the age of 31; gastrostomy at the age of 37. Subject's father died at 52 of a pancreatic cancer
Atypical symptoms associated	brisk tendon reflexes on the lower limbs but no pyramidal syndrome	motor neuron signs with pyramidal syndrome and limb atrophy at late stage	motor neuron signs with spastic tetraplegia
Cerebral MRI	asymmetric atrophy in frontal, parietal, and temporal areas at the expense of the left side	normal (performed at early stage)	normal (performed at early stage)

Abbreviations are as follows: ICD, impulse control disorder; MMSE, mini-mental state examination; FOG, freezing of gait.

levodopa response). Disease progression, however, was particularly severe, with early cognitive decline, loss of response to treatment, axial symptoms, and dysautonomia. Affected subjects were bedridden within 15 years of clinical onset. Pyramidal signs and motor deficits were observed in two affected individuals. Brain MRI was normal early in the disease, and then bilateral atrophy was observed in the frontal, parietal, and temporal lobes (Table 1). Post-mortem examination of the brain of the affected individual II-1 in family B, who died at age 49 of aspiration pneumonia, showed mild frontal atrophy, including the primary motor area (Figures 2A–2C). The pathology resembled diffuse Lewy body disease. Alpha-synuclein and ubiquitin positive-Lewy bodies were observed in the brainstem, limbic system, hippocampus, and all cortical associative areas, including the parieto-occipital region (Figures 2D–2F, Table S8). Tau-immunoreactive neurofibrillary tangles and neurites were seen in the brainstem, hippocampus, and primary motor cortex (Figure 2G, Table S8). There were no glial-, α -synuclein-, A β -, or TDP-43-immunoreactive inclusions.

Loss of VPS13C Function Affects Mitochondrial Morphology, Transmembrane Potential, and Respiration

To investigate the function of VPS13C, we explored its subcellular distribution in human HEK293T by sucrose

gradient fractionation (Figure 3A). VPS13C was enriched in the low-density fractions 1 and 2 containing the early endosomal marker EEA1 and most of the cytosolic protein Parkin. VPS13C was also found in higher-density fractions containing membrane and soluble markers of the Golgi apparatus (GOLGA2), the ER (Calnexin, BiP), and mitochondria (TOMM70, PMPCB, PINK1). Here, it was most abundant in fractions 8–10, containing the greatest proportion of TOMM70 and PMPCB. The mitochondrial localization of VPS13C was confirmed in mitochondrion-enriched fractions and pure mitochondria from HEK293T and COS-7 cells (Figures 3B and 3C). Limited trypsin digestion of mitochondrion-enriched fractions caused concomitant loss of VPS13C and the outer mitochondrial membrane receptor TOMM70 under conditions preserving the outer mitochondrial membrane channel TOMM40 and mitochondrial matrix enzyme PMPCB, indicating that VPS13C is located on the mitochondrial surface (Figure 3C).

We then investigated the impact of loss of VPS13C function on mitochondrial morphology, transmembrane potential, and respiration, reported to be affected in models of PINK1 or PARK2 deficiency.^{24,25} The siRNA-mediated silencing of VPS13C in COS-7 cells reduced VPS13C mRNA levels to no more than 25% of the control condition (Figure S6) and was associated with perinuclear redistribution of mitochondria and mitochondrial

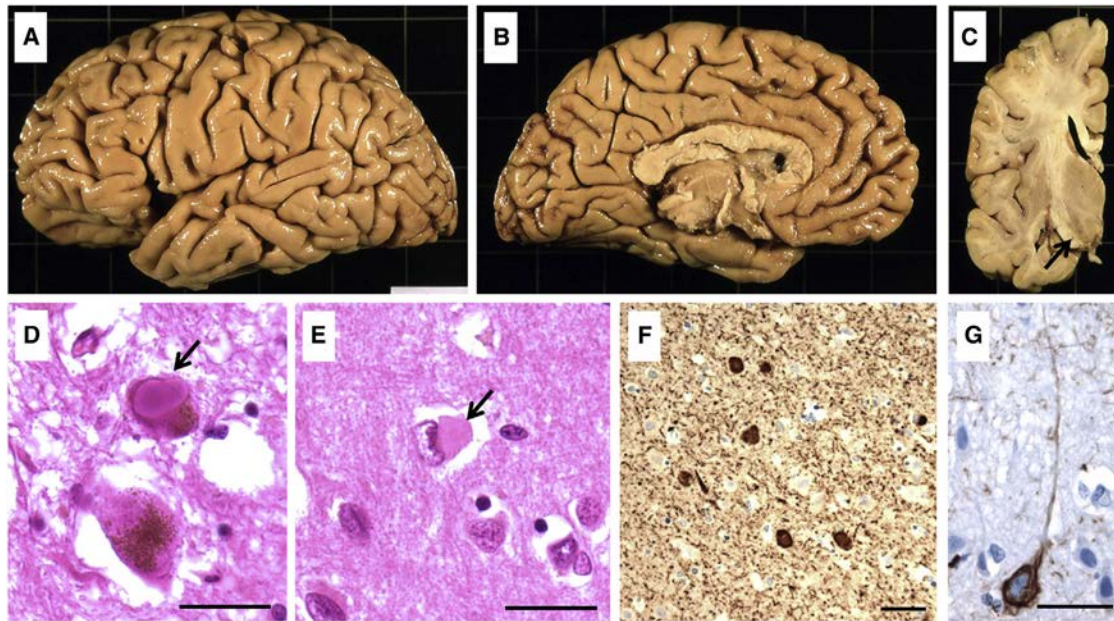


Figure 2. Neuropathology in the Proband of Family B with *c.[806_807insCAGA];[9568G>T]* *VPS13C* Mutations Shows Abundant α -Synucleinopathy

(A–C) Macroscopic appearance of the left hemisphere (fixed): lateral view (A); medial view (B); coronal section at the level of the cerebral peduncle (C).

(D and E) Lewy bodies in pigmented neurons in the substantia nigra (D, arrow, hematoxylin-eosin [HE] staining) and the parietal neocortex (E, arrowhead, HE staining).

(F) Representative image of α -synuclein immunoreactivity in the frontal cortex showing abundant Lewy bodies and neurites.

(G) Tau-immunoreactive neurofibrillary tangles in the primary motor cortex.

Scale bars for microscopic images represent 50 μ m.

fragmentation, as confirmed by quantitative image analysis (Figure 4A). Evaluation of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_{mt}$) with the potentiometric dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) revealed a significant decrease in the mean fluorescence intensity of mitochondria in cells depleted of *VPS13C* (Figure 4B). The $\Delta\Psi_{mt}$ decrease was accompanied by an increase in maximal respiration rates and respiratory reserve, as assessed by high-resolution respirometry in intact cells (Figure 4C). Similar results were obtained in HEK293T cells (data not shown).

Loss of *VPS13C* Function Exacerbates PINK1/Parkin-Dependent Responses to Mitochondrial Depolarization

We further investigated the relationship between *VPS13C* and *PINK1* and *PARK2*, both at the transcript and protein levels, with respect to their well-characterized response to mitochondrial damage. PINK1 accumulates on mitochondria and recruits Parkin to initiate mitophagy in response to mitochondrial dysfunction.⁴ Mitochondrial depolarization, triggered by the protonophore CCCP, partially redistributed *VPS13C* from mitochondria to the cytoplasm without significantly changing *VPS13C* transcript levels (Figures 5A, 5B, and 5F, left); under these conditions, PINK1 accumulated on mitochondria, as expected.⁴ *VPS13C* silencing did not affect PINK1 levels under basal conditions, but it exacerbated CCCP-induced mitochon-

drial accumulation of PINK1 without impacting *PINK1* mRNA abundance (Figures 5C, 5D, and 5F, middle). Moreover, *VPS13C* silencing enhanced mitochondrial translocation of Parkin triggered by CCCP (Figures 5C and 5E). It also upregulated Parkin protein abundance in the cytosol without affecting *PARK2* transcript levels at 3 hr of CCCP treatment (Figures 5E and 5F, right). *PARK2* expression increases in response to mitochondrial damage caused by mitochondrial toxins, including CCCP.^{26,27} Here, *PARK2* transcript levels tended to be higher at 48 hr of CCCP treatment (Figure 5F, right). This response was significantly enhanced after silencing of *VPS13C* or *PINK1*, suggesting greater mitochondrial damage. *PINK1* silencing was also associated with downregulation of *VPS13C* transcript levels under basal conditions (Figure 5F, left), an effect that was reversed by PINK1 overproduction (Figure S5), indicating the existence of multiple regulatory loops between *VPS13C*, *PARK2*, and *PINK1*. Consistent with the above described effects on PINK1 and Parkin, *VPS13C* silencing exacerbated PINK1/Parkin-mediated mitophagy triggered by CCCP in COS-7 cells, a model that we previously validated for the study of this process (Figures 6 and S6).^{17,19}

Discussion

This study establishes *VPS13C* mutations as a monogenic cause of EO AR parkinsonism. Homozygous or compound

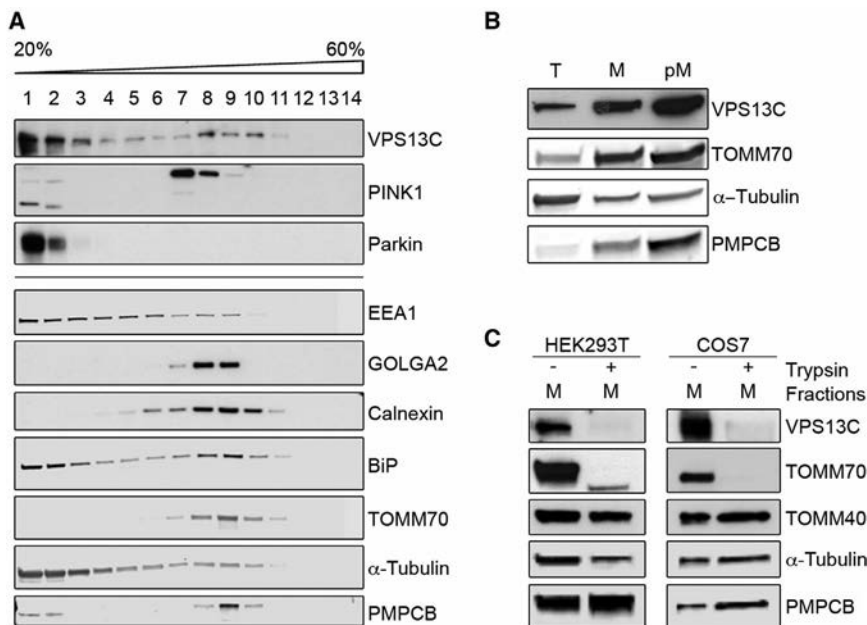


Figure 3. A Pool of VPS13C Is Located on the Outer Mitochondrial Membrane

(A) Sucrose gradient fractionation illustrating the subcellular distribution of endogenous VPS13C in HEK293T. Note the enrichment of the protein in fractions 1–3 and 8–10. Soluble endoplasmic reticulum (ER, BiP) and mitochondrial (PMPCB) markers in fractions 1 and 2 reflect organelle damage during fractionation.

(B) Western blot showing VPS13C immunoreactivity in mitochondria purified by Percoll gradient centrifugation from HEK293T cells (pM fraction). Note the enrichment in VPS13C and the mitochondrial markers TOMM70 and PMPCB in the pM fraction compared to the mitochondrion-enriched fraction (M). Abbreviation is as follows: T, total lysate.

(C) Limited trypsin treatment of mitochondrion-enriched fractions (M) from HEK293T or COS-7 cells caused loss of VPS13C and the mitochondrial surface marker TOMM70; the outer mitochondrial membrane channel TOMM40 and the matrix marker PMPCB are preserved.

heterozygous truncating mutations in three PD-affected individuals, absent from or present in the heterozygous state in available unaffected family members and in a very large number of control subjects, strongly support the pathogenicity of *VPS13C* in EO parkinsonism. We identified three affected individuals harboring *VPS13C* mutations and could not perform co-segregation analyses, due to the lack of additional affected relatives in the corresponding families. However, the affected individuals shared a specific, rare, and extremely distinctive phenotype consisting of EO parkinsonism with very rapid progression and dementia, which argues strongly for the pathogenicity of *VPS13C* mutations. The initial phenotype, EO parkinsonism and a good response to levodopa treatment, is similar to that of PD-affected individuals with *PARK2*, *PINK1*, or *DJ-1* mutations. However, the affected individuals rapidly became bedridden because of the worsening of motor dysfunction and loss of response to treatment. Dysautonomia and pyramidal signs were observed in two affected individuals, also distinguishing the phenotype from the classical, slowly progressive EO PD. The presence of numerous α -synuclein and ubiquitin-positive-Lewy bodies in the brainstem, limbic system, and many cortical areas was reminiscent of diffuse Lewy body disease, consistent with a motor phenotype associated with dementia. α -synuclein Lewy bodies are absent in most PD-affected individuals with *PARK2* mutations,²⁸ but were observed in the single autopsy case subject with *PINK1* mutations reported.²⁹ Tau-immunoreactive neurofibrillary tangles and neurites were also observed in case subjects with *PARK2* mutations.²⁸ These features define *VPS13C*-associated EO parkinsonism as a clinical, pathological, and genetic entity belonging to the group of synucleinopathies. In addition, our study also provides

31 potential candidate genes harboring disruptive homozygous mutations in a single PD-affected individual. However, genetic replication and functional validation are still needed to confirm their relevance to PD.

Alterations in other members of the *VPS13* family cause AR neurodegenerative disorders: *VPS13A* (MIM: 605978) (CHAC [MIM: 200150]) is mutated in chorea-acanthocytosis characterized by progressive neurodegeneration and red cell acanthocytosis,³⁰ and *VPS13B* (MIM: 607817) (COH1 [MIM: 216550]) is mutated in Cohen syndrome characterized by psychomotor retardation, microencephaly, and eye abnormalities.³¹ *VPS13A*, *VPS13B*, and *VPS13C* are also mutated in gastric and colorectal cancers with unstable microsatellites.³²

VPS13C belongs to a family of large *VPS13* proteins (*VPS13A–D*) similar to yeast *Vps13p*.²³ Like yeast *Vps*, mammalian vacuolar sorting proteins are crucial for vesicular transport.³³ Initial studies linked yeast *VPS13* orthologs to the delivery of proteins to the vacuole, the mammalian lysosome equivalent.³⁴ Mutations in *VPS35*, encoding a core component of the retromer complex regulating endosomal protein sorting, are implicated in AD late-onset PD.^{35,36} *VPS35* is also involved in protein trafficking from mitochondria to peroxisomes through mitochondria-derived vesicles.³⁷ *PINK1* and *Parkin* play a role in this transport route, which delivers damaged mitochondrial cargo directly to lysosomes in response to mitochondrial stress.⁶ However, the machinery regulating cargo selection and sorting into vesicles remains to be identified. *VPS13C* might be involved in this process. Such a mechanism would be consistent with its mitochondrial localization and the observed relocation to the cytosol in response to mitochondrial damage.

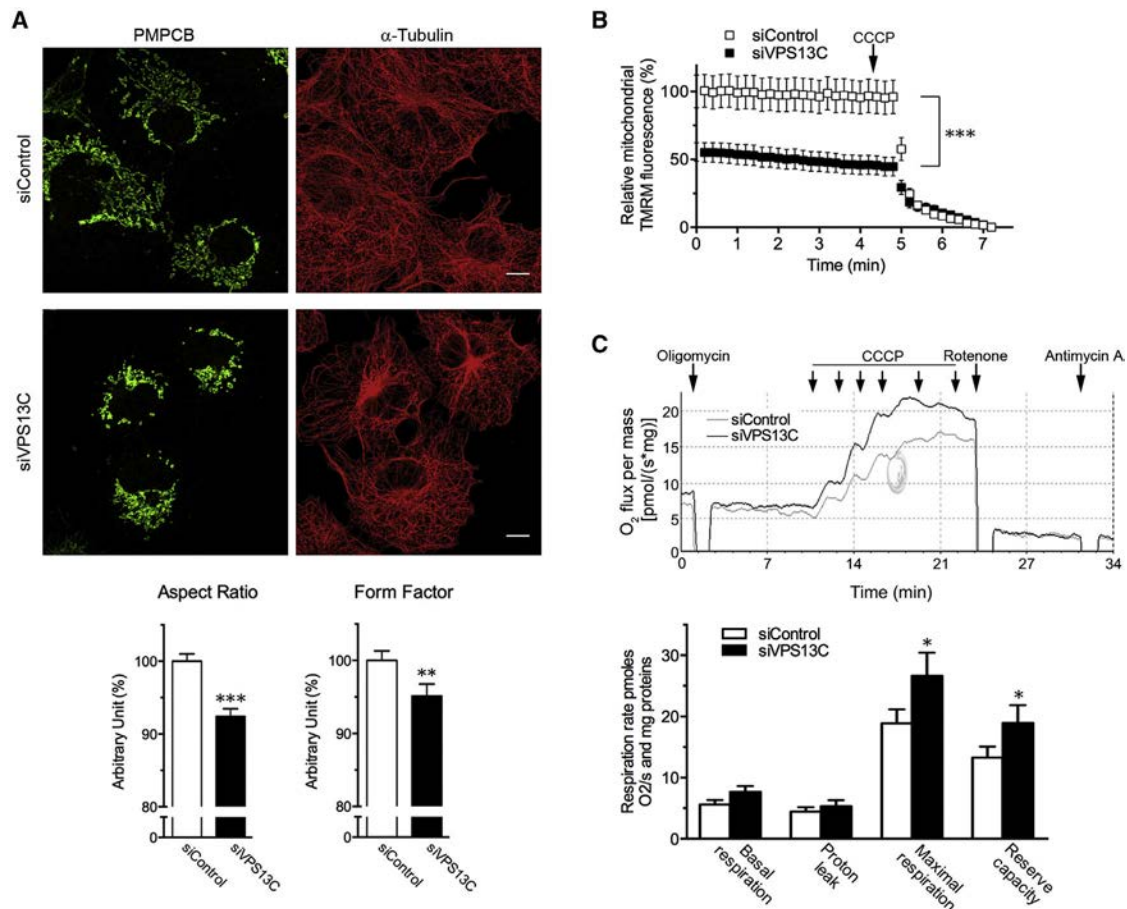


Figure 4. VPS13C Silencing Impacts Mitochondrial Morphology, Transmembrane Potential, and Respiration

(A) Representative immunofluorescence staining illustrating mitochondrial perinuclear redistribution and fragmentation in COS-7 cells silenced for *VPS13C* (siVPS13C, 30 nM) compared to cells treated with control siRNA (siControl, 30 nM): green, mitochondrial matrix marker PMPCB; red, α -Tubulin. *VPS13C* silencing reduced *VPS13C* mRNA levels to no more than 25% of the control condition (see Figure S6). Scale bars represent 10 μ m. Quantification of aspect ratio and form factor (see Subjects and Methods, Koopman et al.²¹, and Buhlman et al.²²) shows reduced mitochondrial network complexity in siVPS13C-treated cells (means \pm SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, of $n = 88$ or 86 cells scored per condition).

(B) Analysis of the relative TMRM fluorescence of mitochondria in COS-7 cells transfected as in (A), illustrating the decrease in $\Delta\Psi_{mt}$ in cells depleted for *VPS13C*. $n = 40$ cells per condition from one experiment representative of three carried out. *** $p < 0.001$.

(C) Oxygen consumption rates in intact COS-7 cells transfected with siControl or siVPS13C. The top panel shows the oxygen flux corrected for instrumental background from one representative experiment. The graph in the bottom panel displays the respiration rates. Absence of *VPS13C* is associated with increased maximal respiration (= maximal uncoupled respiration under CCCP – non-mitochondrial respiration in the presence of the mitochondrial complex I and III inhibitors, rotenone, and antimycin A) and reserve capacity (= maximal uncoupled respiration – basal respiration before the addition of the complex V inhibitor oligomycin). Means \pm SEM; * $p < 0.05$, of six independent experiments.

Several other observations in mammalian cells suggest that, like PINK1 and Parkin, *VPS13C* plays a role in mitochondrial maintenance. *VPS13C* depletion led to reduction of $\Delta\Psi_{mt}$ and mitochondrial fragmentation in cell lines. Moreover, it enhanced maximal respiration rates, suggesting compensatory adaptation aimed at preserving $\Delta\Psi_{mt}$ levels. In neuronal cells, which produce ATP mainly through mitochondrial oxidative phosphorylation and are unable to switch to glycolysis under acute mitochondrial stress, such changes might in the long term exacerbate generation of reactive oxygen species and trigger irreversible mitochondrial damage.^{38,39} *VPS13C* depletion also upregulated PINK1/Parkin-dependent mitophagy, and, similarly to PINK1 depletion, it enhanced the previ-

ously reported transcriptional upregulation of Parkin in response to toxin-induced mitochondrial dysfunction. Overall, these data suggest that loss of *VPS13C* function increases mitochondrial vulnerability to stress and thereby activates PINK1/Parkin-dependent mitochondrial quality control pathways. Based on the inverse relationship between *VPS13C* and PINK1 protein levels on the mitochondrial surface, we cannot exclude that *VPS13C* also acts as a negative regulator of PINK1.

Mitochondrial function is ensured by a series of interconnected finely orchestrated pathways, activated in response to different degrees of mitochondrial dysfunction.⁴⁰ Excessive mitophagy has been associated with α -synuclein-dependent neurodegeneration.⁴¹ Further work is required

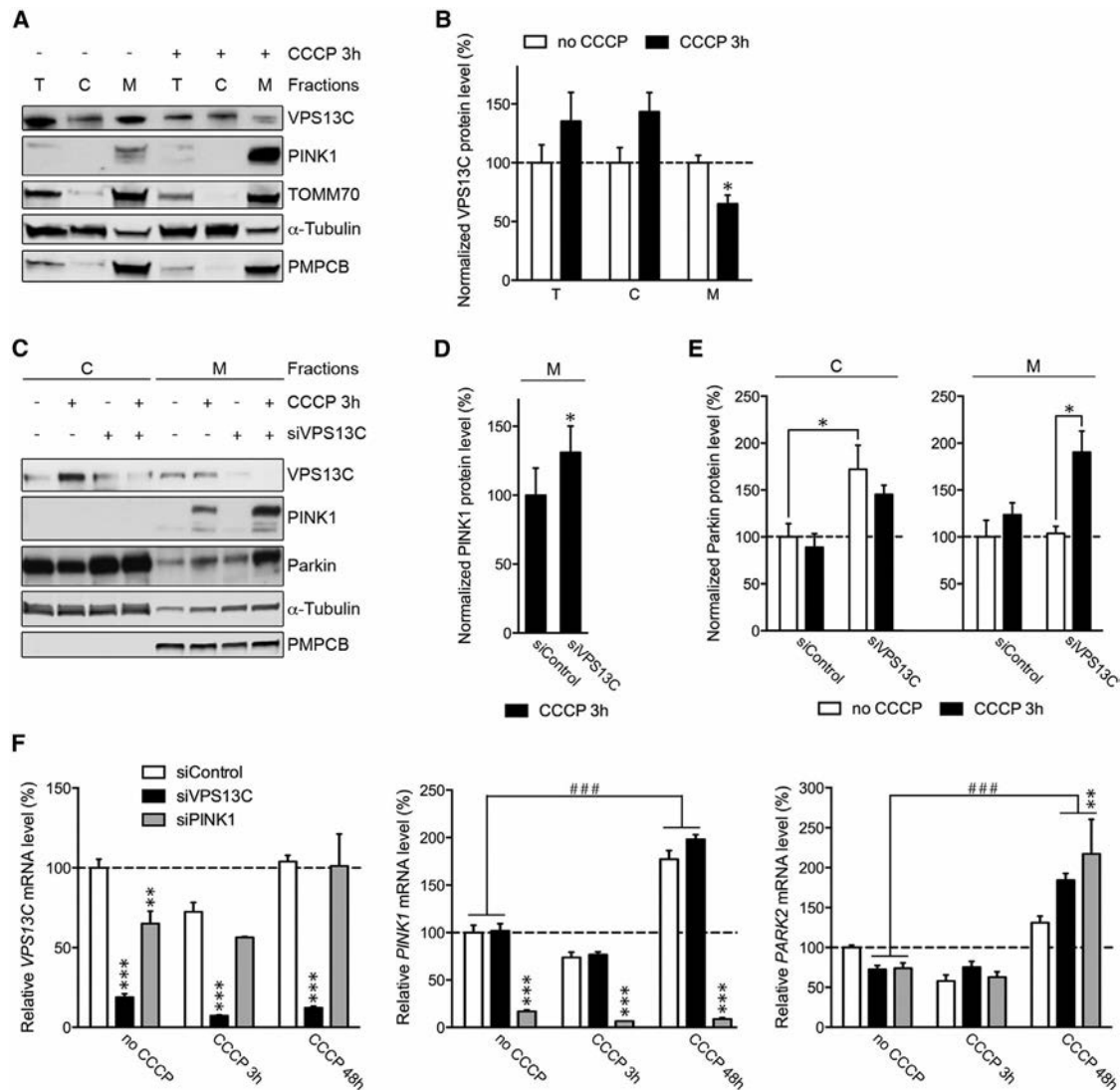


Figure 5. Loss of VPS13C Function Enhances Mitochondrial Accumulation of PINK1, Recruitment of Parkin, and *PARK2* Upregulation in Response to CCCP

(A and B) Western blot (A) and corresponding VPS13C protein levels (B) (normalized to α -Tubulin or PMPCB) in cytosolic (C), mitochondrion-enriched (M), and total (T) cell fractions from HEK293T cells treated or not with CCCP (10 μ M, 3 hr). VPS13C levels decreased significantly in mitochondria after CCCP treatment, but tended to increase in cytosol (means \pm SEM; * p < 0.05, of six independent fractionation experiments).

(C–E) Western blot (C) and corresponding normalized protein levels (D, E) in cytosolic and mitochondrion-enriched fractions from HEK293T transfected with 30 nM of control siRNA (siControl) or siRNA targeting *VPS13C* (siVPS13C).

(D) CCCP treatment resulted in accumulation of PINK1 (endogenous) in mitochondrion-enriched fractions (M) after treatment with siControl (–) and, more significantly, with siVPS13C (+).

(E) Accumulation of Parkin (endogenous) on depolarized mitochondria was also strongly enhanced in cells treated with siVPS13C. In addition, Parkin levels were upregulated in the cytosolic (C) fractions, particularly in untreated cells (means \pm SEM; * p < 0.05 of four independent fractionation experiments).

(F) Quantitative real-time RT-PCR showing relative mRNA levels, normalized to α -actin (*ACTB*), in HEK293T cells treated with control siRNA (siControl), or siRNA targeting *VPS13C* (siVPS13C) or *PINK1* (siPINK1), under basal conditions or after CCCP treatment. Note the more than 30% decrease in *VPS13C* mRNA levels after *PINK1* silencing under basal conditions, but not after CCCP treatment (left). Note also that *VPS13C* and *PINK1* silencing enhance the upregulation of *PARK2* mRNA at 48 hr of CCCP treatment (right); means \pm SEM of three to nine replicates per condition from two independent experiments (** p < 0.01; *** p < 0.001 compared to siControl within each condition of CCCP treatment; ### p < 0.001 between the indicated conditions of CCCP treatments).

to clarify the role of VPS13C in mitochondrial maintenance and dissect its possible relation to PINK1/Parkin-dependent pathways.

Enrichment of VPS13C in cell fractions containing the early endosomal marker EEA1 suggests broader roles for

VPS13C in vesicular trafficking. A more general involvement in endosomal-lysosomal trafficking, possibly counteracting α -synuclein pathology as recently reported for VPS35,⁴² might explain the diffuse α -synuclein pathology and rapid progression to dementia in individuals with *VPS13C*

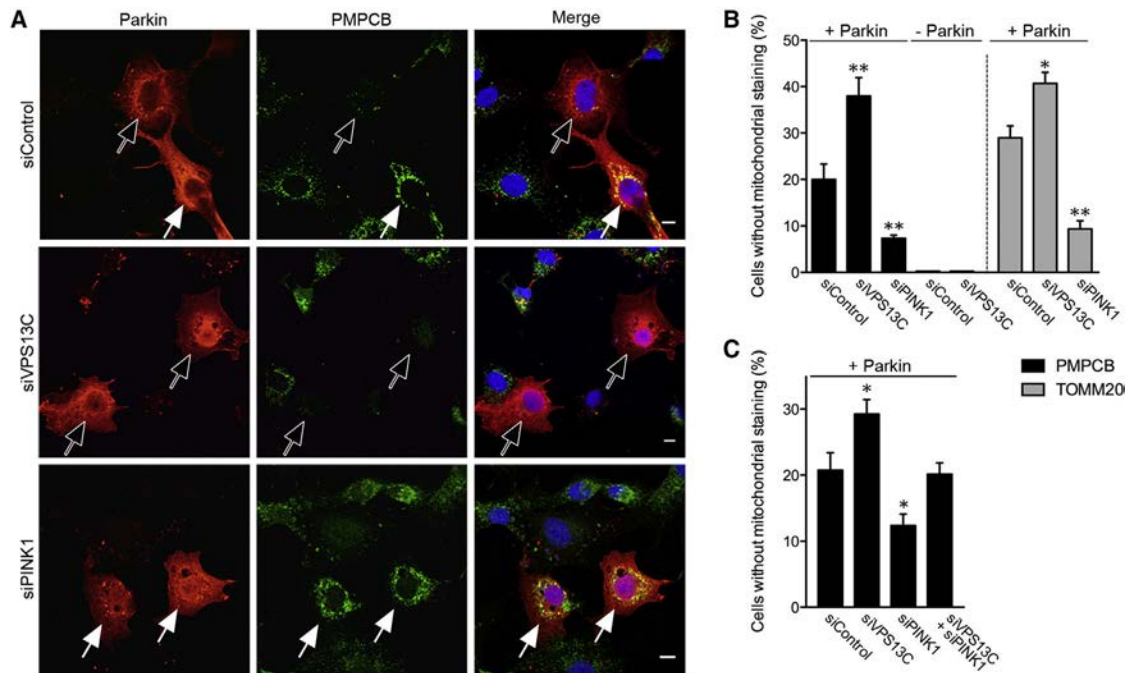


Figure 6. Loss of *VPS13C* Function Exacerbates *PINK1*/Parkin-Dependent Mitophagy

(A) Immunofluorescence staining of a representative experiment illustrating *PINK1*/Parkin-dependent mitophagy in COS-7 cells overproducing Parkin and silenced for *VPS13C* or *PINK1* (20 nM siRNA) after CCCP treatment (10 μ M for 48 hr): red, Parkin; green, mitochondrial matrix marker PMPCB. Open arrows indicate loss of mitochondrial networks; white arrows show preserved networks. Scale bars represent 10 μ m.

(B) Quantification of mitophagy in the conditions described in (A), expressed as the proportion of COS-7 cells without PMPCB (black bars) or TOMM20 (gray bars) staining; the si*VPS13C* treatment increased and si*PINK1* decreased the proportion. In the absence of exogenous Parkin (–Parkin; cells overproducing the control protein EGFP) or CCCP (not shown), all the cells harbored normal mitochondrial PMPCB staining, whether or not *VPS13C* was silenced (means \pm SEM; * p < 0.05, ** p < 0.01 of 3 independent experiments; 100 cells scored per condition).

(C) Proportion of COS-7 cells without PMPCB staining after transfection with half-doses (10 nM) of each siRNA and 48 hr of CCCP treatment. The mitophagy-promoting effect of *VPS13C* depletion was abolished by concomitant silencing of *PINK1* (means \pm SEM; * p < 0.05 of 3 independent experiments; 100 cells scored per condition).

mutations. Such a mechanism would potentially represent a unifying link with cellular pathways involved in AD PD.

In summary, we describe truncating mutations in *VPS13C* associated with EO parkinsonism with rapid progression and widely distributed Lewy bodies. A meta-analysis of PD genome-wide association studies recently identified a susceptibility allele ~250 kb from *VPS13C* but not associated with either CpG methylation or mRNA expression,⁴³ suggesting that *VPS13C* can either cause a monogenic form of EO parkinsonism or confer genetic susceptibility to PD. Although we are confident that our work strongly implicates *VPS13C* mutations in PD, further genetic studies in other populations are needed to confirm their pathogenicity. The development of animal models in which *VPS13C* is stably inactivated will help dissect the mechanisms by which loss of *VPS13C* function affects the survival of dopaminergic neurons.

Accession Numbers

The accession numbers for the variations in *VPS13C* reported in this paper are ClinVar: SCV000262816, SCV000262817, SCV000262818, SCV000262819, and SCV000262820.

Supplemental Data

Supplemental Data include six figures and eight tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.014>.

Consortia

Members of The French Parkinson's Disease Genetics Study (PDG) are Suzanne Lesage, François Tison, Marie Vidailhet, Jean-Christophe Corvol, Yves Agid, Mathieu Anheim, Anne-Marie Bonnet, Michel Borg, Emmanuel Broussolle, Philippe Damier, Alain Destée, Alexandra Dürr, Franck Durif, Paul Krack, Stephan Klebe, Ebba Lohmann, Maria Martinez, Pierre Pollak, Olivier Rascol, Christine Tranchant, Marc Verin, François Viallet, and Alexis Brice.

Members of The International Parkinson Disease Genomics Consortium (IPDGC) are Suzanne Lesage, Elisa Majounie, François Tison, Marie Vidailhet, Jean Christophe Corvol, Michael A. Nalls, Dena G. Hernandez, J. Raphael Gibbs, Alexandra Dürr, Sampath Arepalli, Roger A. Barker, Yoav Ben-Shlomo, Daniela Berg, Francesco Bettella, Kailash Bhatia, Rob M.A. de Bie, Alessandro Biffi, Bastiaan R. Bloem, Zoltan Bochdanovits, Michael Bonin, Jose M. Bras, Kathrin Brockmann, Janet Brooks, David J. Burn, Gavin Charlesworth, Honglei Chen, Patrick F. Chinnery, Sean Chong, Carl E. Clarke, Mark R. Cookson, Carl Counsell, Philippe Damier,

Jean-François Dartigues, Panos Deloukas, Günther Deuschl, David T. Dexter, Karin D. van Dijk, Allissa Dillman, Jing Dong, Frank Durif, Sarah Edkins, Valentina Escott-Price, Jonathan R. Evans, Thomas Foltynie, Jianjun Gao, Michelle Gardner, Alison Goate, Emma Gray, Rita Guerreiro, Clare Harris, Jacobus J. van Hilten, Albert Hofman, Albert Hollenbeck, Peter Holmans, Janice Holton, Michèle Hu, Xuemei Huang, Heiko Huber, Gavin Hudson, Sarah E. Hunt, Johanna Huttenlocher, Thomas Illig, Pálmi V. Jónsson, Laura L. Kilarski, Iris E. Jansen, Jean-Charles Lambert, Cordelia Langford, Andrew Lees, Peter Lichtner, Patricia Limousin, Grisel Lopez, Delia Lorenz, Steven Lubbe, Codrin Lungu, María Martínez, Walter Mätzler, Alisdair McNeill, Catriona Moorby, Matthew Moore, Karen E. Morrison, Ese Mudanohwo, Sean S. O'Sullivan, Michael J. Owen, Justin Pearson, Joel S. Perlmutter, Hjörvar Pétursson, Vincent Plagnol, Pierre Pollak, Bart Post, Simon Potter, Bernard Ravina, Tamas Revesz, Olaf Riess, Fernando Rivadeneira, Patrizia Rizzu, Mina Ryten, Mohamad Saad, Javier Simón-Sánchez, Stephen Sawcer, Anthony Schapira, Hans Scheffer, Claudia Schulte, Manu Sharma, Karen Shaw, Una-Marie Sheerin, Ira Shoulson, Joshua Shulman, Ellen Sidransky, Chris C.A. Spencer, Hreinn Stefánsson, Kári Stefánsson, Joanna D. Stockton, Amy Strange, Kevin Talbot, Charlie M. Tanner, Avazeh Tashakkori-Ghanbaria, Daniah Trabzuni, Bryan J. Traynor, André G. Uitterlinden, Daan Velseboer, Robert Walker, Bart van de Warrenburg, Mirdhu Wickremaratchi, Caroline H. Williams-Gray, Sophie Winder-Rhodes, Isabel Wurster, Nigel Williams, Huw R. Morris, Peter Heutink, John Hardy, Nicholas W. Wood, Thomas Gasser, Andrew B. Singleton, and Alexis Brice.

Acknowledgments

The authors are grateful to the families for their participation in this study. We thank Merle Ruberg for critical reading of the manuscript, the DNA and Cell Bank of ICM, the Plate-Forme d'Imagerie Cellulaire de la Pitié-Salpêtrière (PICPS), and Ebru Özer and Meltem Pak for sample preparation. We are grateful to the Lille brain bank for the gift of a brain ("Lille Neurobank," BB-0033-00030). This study was supported by the National Research Funding Agency (ANR-08-NEUR-004-01) in association with ERA-NET NEURON, the France-Parkinson Association, the Roger de Spoelberch Foundation (R12123DD), the French Academy of Sciences, the French program "Investissements d'avenir" (ANR-10-IAIHU-06), and the European Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research (JPND-COURAGE-PD) project. This study was also supported by the Intramural Research Program of the National Institute on Aging and the National Institutes of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Department of Health and Human Services (project Z01 AG000958 and by MRC Grant G1100643/1), by the European Social Fund, and by the Ministry of Science, Research, and the Arts, Baden-Württemberg. This work was also supported by the Department of Defense, including grant 10064005/11348001, the French Health Ministry (PHRC), France Parkinson Association, Lille University Hospital (A. Destée), the Atip/Avenir from the National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the ANR in association with the ERA-NET E-rare program, the France Alzheimer Association, and a Career Integration Grant from Marie Curie Actions (E.K.). C.P. received a postdoctoral fellowship from the Cognacq-Jay Foundation. S.C. received postdoctoral fellowships from EMBO and AFM-Telethon.

Received: November 16, 2015

Accepted: January 20, 2016

Published: February 25, 2016

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

1000 Genomes, <http://browser.1000genomes.org>
ANNOVAR, <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>
Burrows-Wheeler Aligner, <http://bio-bwa.sourceforge.net/>
ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>
ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>
IGV, <http://www.broadinstitute.org/igv/>
OMIM, <http://www.omim.org/>
GATK, <https://www.broadinstitute.org/gatk/>
Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>
Ingenuity Variant Analysis, <http://www.ingenuity.com/products/variant-analysis>
MUSCLE, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
NCBI Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
Picard, <http://picard.sourceforge.net/>
RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>
Primer3, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
Snpeff, <http://snpeff.sourceforge.net/>
Snpsift, <http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html>
UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>

References

1. Bonifati, V. (2014). Genetics of Parkinson's disease—state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 (Suppl 1), S23–S28.
2. Lücking, C.B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Denèfle, P., Wood, N.W., et al.; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* 342, 1560–1567.
3. Ibáñez, P., Lesage, S., Lohmann, E., Thobois, S., De Michele, G., Borg, M., Agid, Y., Dürr, A., and Brice, A.; French Parkinson's Disease Genetics Study Group (2006). Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain* 129, 686–694.
4. Pickrell, A.M., and Youle, R.J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 85, 257–273.
5. 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., et al. (2013). The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat. Neurosci.* 16, 1257–1265.
6. McLelland, G.-L., Soubannier, V., Chen, C.X., McBride, H.M., and Fon, E.A. (2014). Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J.* 33, 282–295.
7. Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., and Lees, A.J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–184.
8. Leutenegeer, A.-L., Prum, B., Génin, E., Verny, C., Lemaingué, A., Clerget-Darpoux, F., and Thompson, E.A. (2003).

- Estimation of the inbreeding coefficient through use of genomic data. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 516–523.
9. Buée-Scherrer, V., Condamines, O., Mourton-Gilles, C., Jakes, R., Goedert, M., Pau, B., and Delacourte, A. (1996). AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39, 79–88.
 10. Deramecourt, V., Lebert, F., Maurage, C.-A., Fernandez-Gomez, F.-J., Dujardin, S., Colin, M., Sergeant, N., Buée-Scherrer, V., Clot, F., Ber, I.L., et al. (2012). Clinical, neuropathological, and biochemical characterization of the novel tau mutation P332S. *J. Alzheimers Dis.* 31, 741–749.
 11. Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595.
 12. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., and DePristo, M.A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303.
 13. Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 38, e164.
 14. Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
 15. Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., and Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67.
 16. Schneider, T.D., and Stephens, R.M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 18, 6097–6100.
 17. Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Jacoupy, M., Traver, S., Grenier, K., Greene, A.W., Dauphin, A., Waharte, F., Bayot, A., Salamero, J., et al. (2013). The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. *Autophagy* 9, 1801–1817.
 18. Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenaer-Tsapis, R., and Belgareh-Touzé, N. (2008). Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic* 9, 1372–1391.
 19. Bertolin, G., Jacoupy, M., Traver, S., Ferrando-Miguel, R., Saint Georges, T., Grenier, K., Ardila-Osorio, H., Muriel, M.-P., Takahashi, H., Lees, A.J., et al. (2015). Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-related enzyme 17- β hydroxysteroid dehydrogenase type 10. *Cell Death Differ.* 22, 1563–1576.
 20. Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Lebiecinska, M., Duszynski, J., and Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* 4, 1582–1590.
 21. Koopman, W.J.H., Verkaart, S., Visch, H.-J., van der Westhuizen, F.H., Murphy, M.P., van den Heuvel, L.W.P.J., Smeitink, J.A.M., and Willems, P.H.G.M. (2005). Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂-mediated mitochondrial outgrowth. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1440–C1450.
 22. Buhlman, L., Damiano, M., Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Lombès, A., Brice, A., and Corti, O. (2014). Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2012–2026.
 23. Velayos-Baeza, A., Vettori, A., Copley, R.R., Dobson-Stone, C., and Monaco, A.P. (2004). Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics* 84, 536–549.
 24. Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmström, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.-H., Gasser, T., et al. (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J. Neurosci.* 27, 12413–12418.
 25. Mortiboys, H., Thomas, K.J., Koopman, W.J.H., Klaffke, S., Abou-Sleiman, P., Olpin, S., Wood, N.W., Willems, P.H.G.M., Smeitink, J.A.M., Cookson, M.R., and Bandmann, O. (2008). Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann. Neurol.* 64, 555–565.
 26. Henn, I.H., Bouman, L., Schlehe, J.S., Schlierf, A., Schramm, J.E., Wegener, E., Nakaso, K., Culmsee, C., Berninger, B., Krappmann, D., et al. (2007). Parkin mediates neuroprotection through activation of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. *J. Neurosci.* 27, 1868–1878.
 27. Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A.K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., et al. (2011). Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* 18, 769–782.
 28. Doherty, K.M., Silveira-Moriyama, L., Parkkinen, L., Healy, D.G., Farrell, M., Mencacci, N.E., Ahmed, Z., Brett, F.M., Hardy, J., Quinn, N., et al. (2013). Parkin disease: a clinico-pathologic entity? *JAMA Neurol.* 70, 571–579.
 29. Samaranch, L., Lorenzo-Betancor, O., Arbelo, J.M., Ferrer, I., Lorenzo, E., Irigoyen, J., Pastor, M.A., Marrero, C., Isla, C., Herrera-Henriquez, J., and Pastor, P. (2010). PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain* 133, 1128–1142.
 30. Rampoldi, L., Dobson-Stone, C., Rubio, J.P., Danek, A., Chalmers, R.M., Wood, N.W., Verellen, C., Ferrer, X., Malandrini, A., Fabrizi, G.M., et al. (2001). A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nat. Genet.* 28, 119–120.
 31. Kolehmainen, J., Black, G.C.M., Saarinen, A., Chandler, K., Clayton-Smith, J., Träskelin, A.-L., Perveen, R., Kivittie-Kallio, S., Norio, R., Warburg, M., et al. (2003). Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1359–1369.
 32. An, C.H., Kim, Y.R., Kim, H.S., Kim, S.S., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2012). Frameshift mutations of vacuolar protein sorting genes in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *Hum. Pathol.* 43, 40–47.
 33. Richardson, S.C.W., Winistorfer, S.C., Poupon, V., Luzio, J.P., and Piper, R.C. (2004). Mammalian late vacuole protein sorting orthologues participate in early endosomal fusion and interact with the cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 15, 1197–1210.
 34. Bankaitis, V.A., Johnson, L.M., and Emr, S.D. (1986). Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9075–9079.
 35. Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O.A., Dachsel, J.C., Kacherus, J.M., Lincoln, S.J., Soto-Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., Wilhoite, G.J., Bacon, J.A., et al. (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 162–167.
 36. Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S.H., Offman, M.N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E.C., Lichtner, P., et al. (2011). A mutation in VPS35, encoding

- a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 168–175.
37. Braschi, E., Goyon, V., Zunino, R., Mohanty, A., Xu, L., and McBride, H.M. (2010). Vps35 mediates vesicle transport between the mitochondria and peroxisomes. *Curr. Biol.* 20, 1310–1315.
 38. Almeida, A., Almeida, J., Bolaños, J.P., and Moncada, S. (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 15294–15299.
 39. Almeida, A., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2004). Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat. Cell Biol.* 6, 45–51.
 40. Rugarli, E.L., and Langer, T. (2012). Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J.* 31, 1336–1349.
 41. Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Warecki, P., Kuum, M., Zharkovsky, A., and Kaasik, A. (2011). Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J. Biol. Chem.* 286, 10814–10824.
 42. Dhungel, N., Eleuteri, S., Li, L.-B., Kramer, N.J., Chartron, J.W., Spencer, B., Kosberg, K., Fields, J.A., Stafa, K., Adame, A., et al. (2015). Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on α -synuclein. *Neuron* 85, 76–87.
 43. Nalls, M.A., Pankratz, N., Lill, C.M., Do, C.B., Hernandez, D.G., Saad, M., DeStefano, A.L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., et al.; International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Parkinson's Study Group (PSG) Parkinson's Research: The Organized GENetics Initiative (PROGENI); 23andMe; GenePD; NeuroGenetics Research Consortium (NGRC); Hussman Institute of Human Genomics (HIHG); Ashkenazi Jewish Dataset Investigator; Cohorts for Health and Aging Research in Genetic Epidemiology (CHARGE); North American Brain Expression Consortium (NABEC); United Kingdom Brain Expression Consortium (UKBEC); Greek Parkinson's Disease Consortium; Alzheimer Genetic Analysis Group (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 46, 989–993.

Supplemental Information

**Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive
Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and
Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy**

Suzanne Lesage, Valérie Drouet, Elisa Majounie, Vincent Deramecourt, Maxime Jacoupy, Aude Nicolas, Florence Cormier-Dequaire, Sidi Mohamed Hassoun, Claire Pujol, Sorana Ciura, Zoi Erpapazoglou, Tatiana Usenko, Claude-Alain Maurage, Mourad Sahbatou, Stefan Liebau, Jinhui Ding, Basar Bilgic, Murat Emre, Nihan Erginel-Unaltuna, Gamze Guven, François Tison, Christine Tranchant, Marie Vidailhet, Jean-Christophe Corvol, Paul Krack, Anne-Louise Leutenegger, Michael A. Nalls, Dena G. Hernandez, Peter Heutink, J. Raphael Gibbs, John Hardy, Nicholas W. Wood, Thomas Gasser, Alexandra Durr, Jean-François Deleuze, Meriem Tazir, Alain Destée, Ebba Lohmann, Edor Kabashi, Andrew Singleton, Olga Corti, Alexis Brice, French Parkinson's Disease Genetics Study (PDG), and the International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC)

Figure S1. Experimental approach

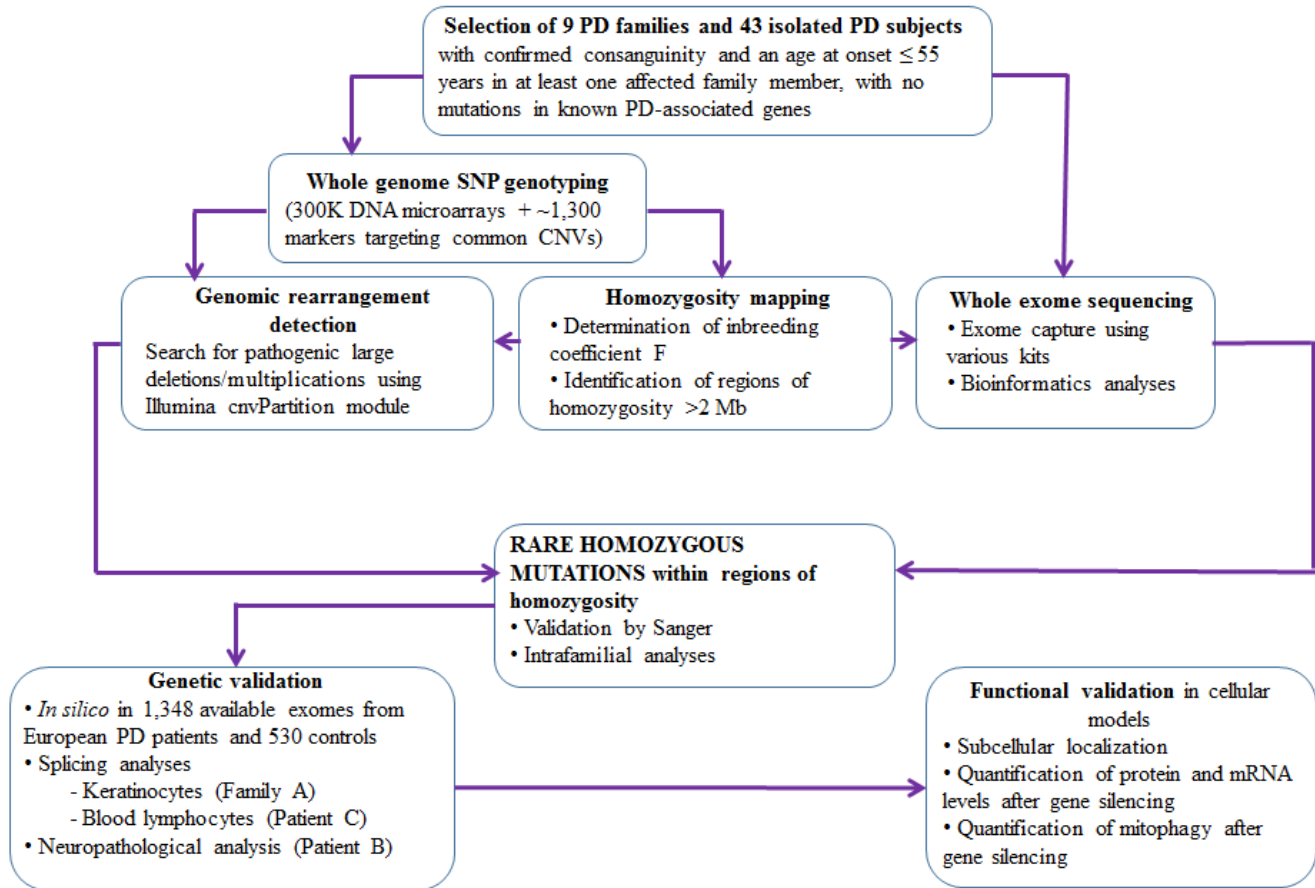


Figure S1. Flow diagram detailing the selection criteria of subjects and the experimental steps of the study

Figure S2. Filtering process

Gene discovery cohort (n=62 PD subjects) vs Controls (n=530)

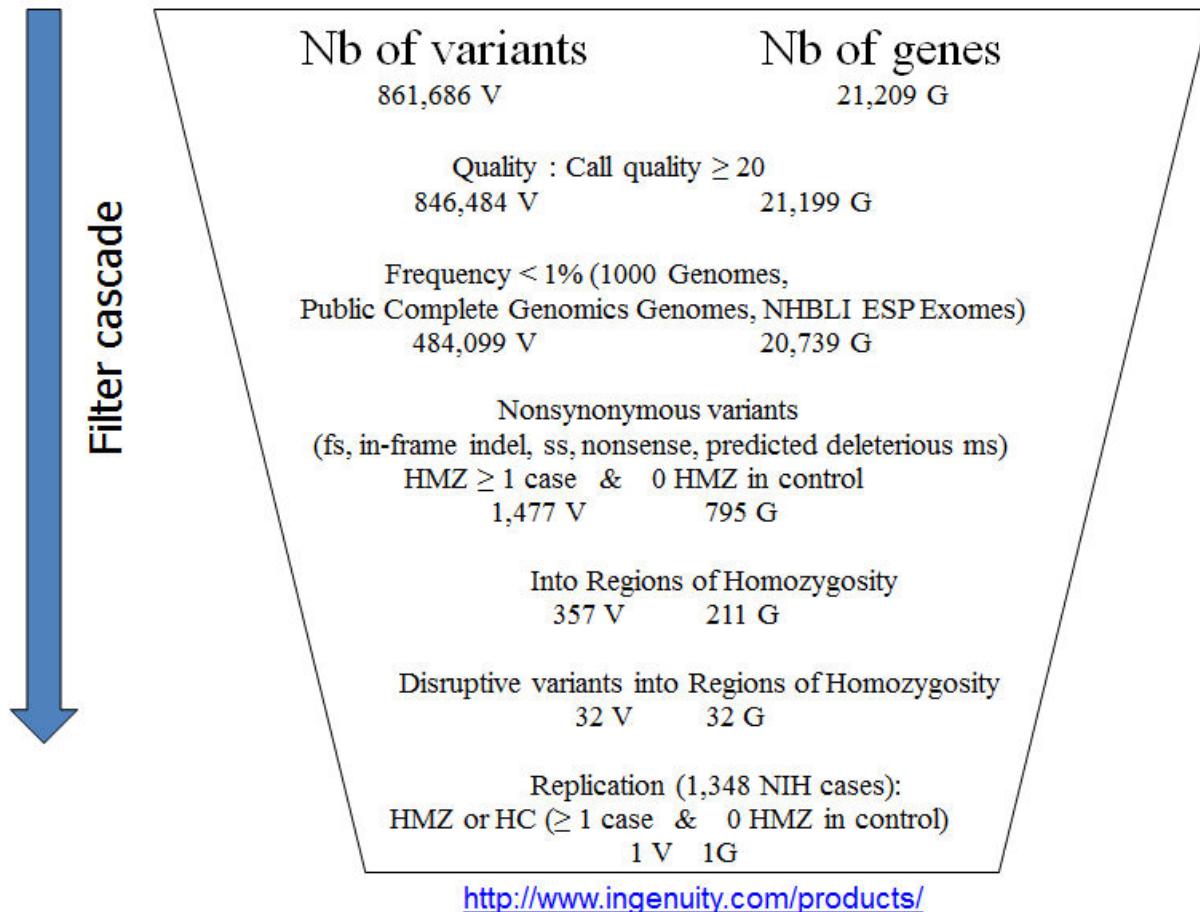


Figure S2. Filtering process in exome analyses

Figure S3. Sanger sequencing electrophoregrams

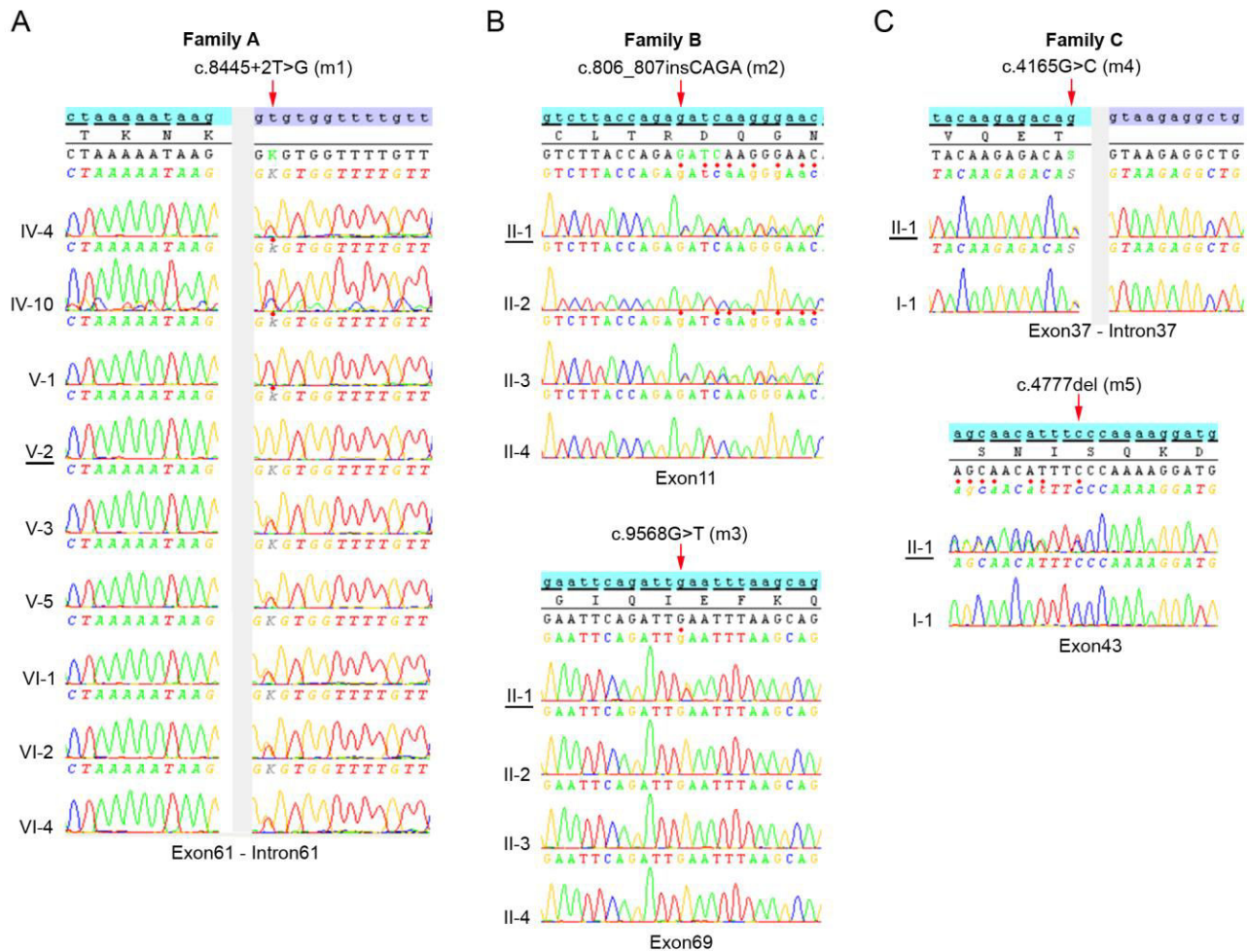


Figure S3. Sanger validation of the variants found in *VPS13C*

Electrophoregrams of the sequences flanking the 5 newly identified variations from 9 members of family A (A), 4 members of family B (B) and 2 members of family C (C). Proband's names are underlined; a red arrow points to sequence changes. Electrophoregrams were obtained with SeqScape software (v2.6, Applied Biosystems).

Figure S4. Splicing analyses

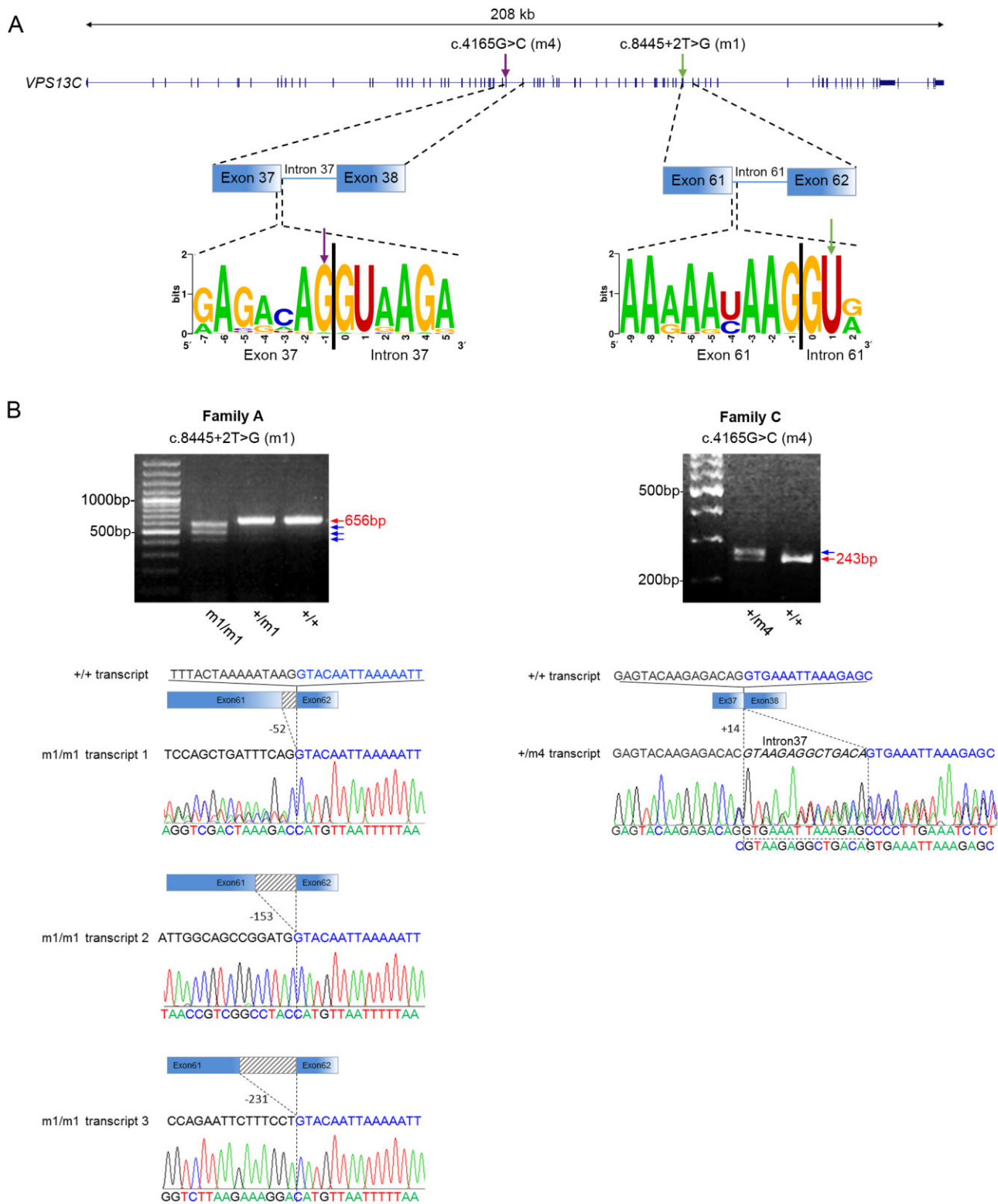


Figure S4. *VPSI3C* mutations and their impact on splicing

(A) Schematic exon-intron structure of *VPSI3C* (NM_020821.2) representing the two variants found in proximity to the splice sites in our families (green arrow, proband from family A; purple arrow, proband from family C). The variations c.4165G>C and c.8445+2T>G are located in donor sites of the exon-intron junction (one base upstream and 2 bases downstream, respectively). Multiple alignments of sequences from 100 vertebrates were extracted from the UCSC website and uploaded for generation of sequence logos (WEBLOGO, <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>); the height of each ribonucleic acid indicates its frequency at each junction (5' → 3'). The bases that were mutated in the exon-intron junctions (c.4165G>C and c.8445+2T>G) are very frequent and highly conserved among vertebrates. Human Splicer Finder v3.0 predicted that the two mutations alter donor sites, probably leading to intron retention, resulting in a frameshift and a premature stop codon.

(B) Variations predicted to lead to splicing defects were analyzed by RT-PCR. The RT-PCR product of expected size is shown with a red arrow, the abnormally sized transcripts are indicated with blue arrows. Electrophoregrams of the sequences of the abnormal transcripts show deletions of 52 to 231 nucleotides of exon 61 in the m1/m1 patient, and an insertion of 14 nucleotides from intron 37 in the +/m4 patient.

Figure S5. Effects of *VPS13C* and *PINK1* silencing on *VPS13C* transcript levels

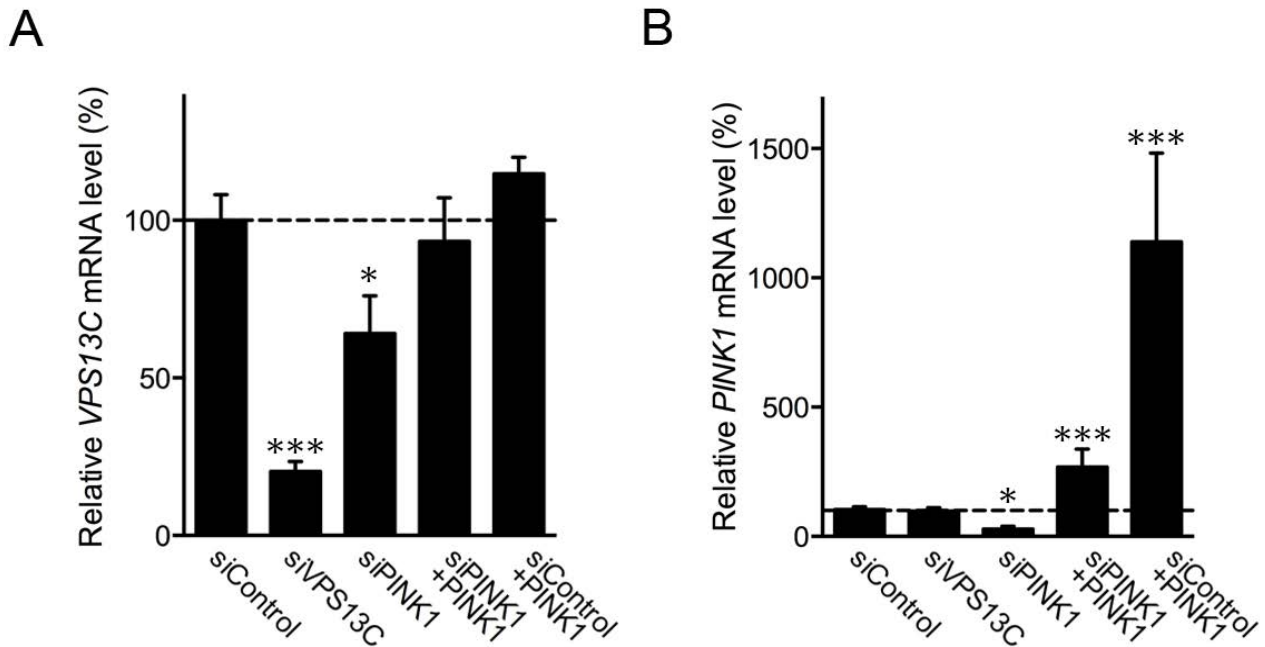


Figure S5. Specificity of the effect of siVPS13C and siPINK1 on VPS13C transcript levels

(A) Quantitative real-time RT-PCR analysis of the effects of siVPS13C and siPINK1 on VPS13C transcript levels. Overexpression of PINK1 reversed the effect of PINK1 depletion on VPS13C mRNA levels.

(B) Transcripts levels of PINK1 in the different conditions (means \pm SEM of 3-6 replicates per condition from 2 independent experiments, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Figure S6. Effects of *VPS13C* silencing on PINK1/Parkin dependent mitophagy

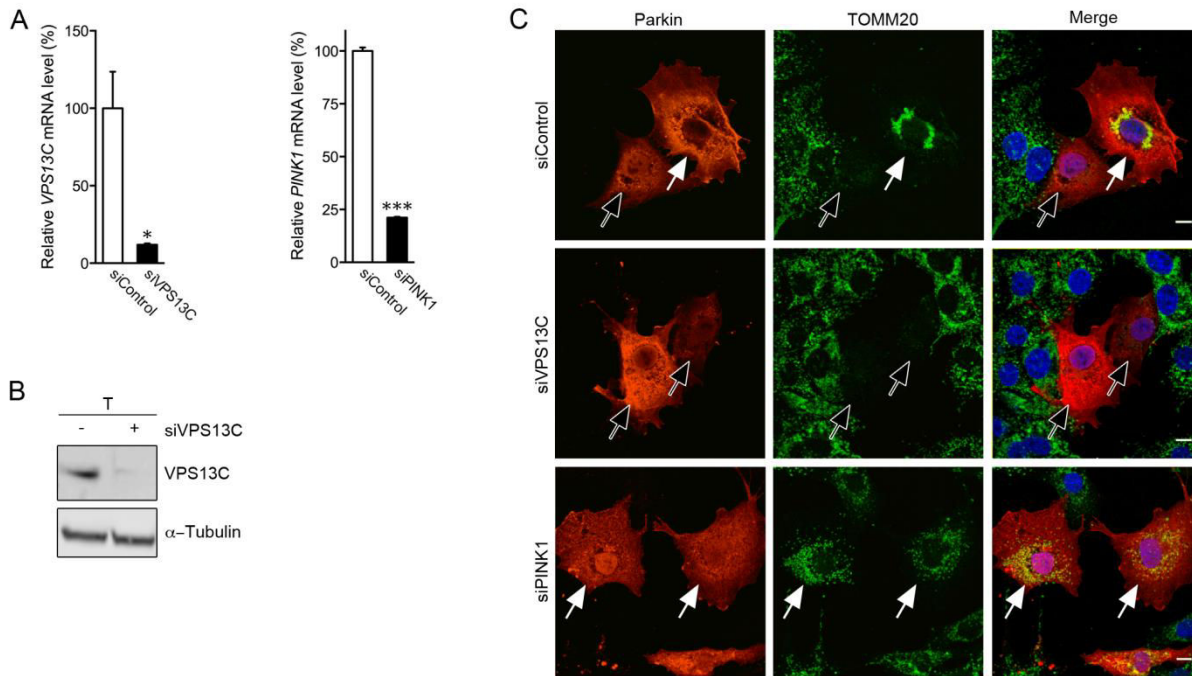


Figure S6. *VPS13C* silencing in COS-7 cells enhances PINK1/Parkin-dependent mitophagy

(A) Validation of the siRNAs targeting *VPS13C* (siVPS13C) or *PINK1* (siPINK1) by quantitative real-time RT-PCR in COS7 cells under basal conditions. The graphs show relative mRNA levels, normalized to β -actin (*ACTB*), of a representative experiment performed in triplicate. Data are expressed as means \pm SEM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

(B) Validation of the siVPS13C by western blot analysis of total lysates (T) from COS7 cells.

(C) Immunofluorescence staining of the mitochondrial marker TOMM20 in COS-7 cells overproducing Parkin and silenced for *VPS13C* or *PINK1* (20 nM siRNA) illustrating PINK1/Parkin-dependent mitophagy. Open and white arrows indicate loss of mitochondrial networks or their preservation, respectively. Scale bar 10 μ m.

II.2. Réponse au stress mitochondrial dans les neurones : rôle des protéines PINK1 et Parkine

Partie 5 : **PINK1/Parkin-dependent mitochondrial degradation is coupled with mitochondrial biogenesis and mt-UPR in neurons.** (en préparation)

PINK1 et Parkine sont recrutés au niveau de la machinerie TOM dans des neurones soumis à un stress mitochondrial

Nous avons tout d'abord cherché à savoir si la Parkine endogène était également recrutée au niveau des mitochondries endommagées dans des cultures primaires de neurones murins soumis à un stress mitochondrial engendré par le protonophore CCCP comme c'est le cas dans des lignées cellulaires [Bertolin *et al.*, 2013]. En effet, l'existence d'une mitophagie PINK1- et Parkine-dépendante dans les neurones est controversée [Grenier *et al.*, 2013] (**Paragraphe IV.1**). Par une analyse en microscopie confocale, il apparaît que dans des neurones corticaux de souris sauvages traités par le CCCP, les immunomarquages des protéines PINK1 et Parkine se retrouvent être co-localisés avec celui du récepteur Tom70 de la machinerie TOM. De manière surprenante car jamais décrit dans la littérature, nous montrons que l'enrichissement du marquage mitochondrial de PINK1 n'est pas retrouvé dans les neurones de souris *PARK2^{-/-}*, ce qui suggère un rôle de la Parkine dans la stabilisation mitochondriale de PINK1 (**Figure 1A,B**).

En utilisant la technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur, qui permet d'étudier des proximités moléculaires *in cellulo*, nous confirmons que comme c'est le cas dans les cellules COS7 et HEK293T, la Parkine et PINK1 interagissent avec les sous-unités Tom40 et Tom70 dans les neurones soumis à un stress mitochondrial (**Figure 1C,D**). Comme pour les analyses de co-localisation, le recrutement de PINK1 est aboli en absence de Parkine, confirmant son implication dans la stabilisation mitochondriale de PINK1.

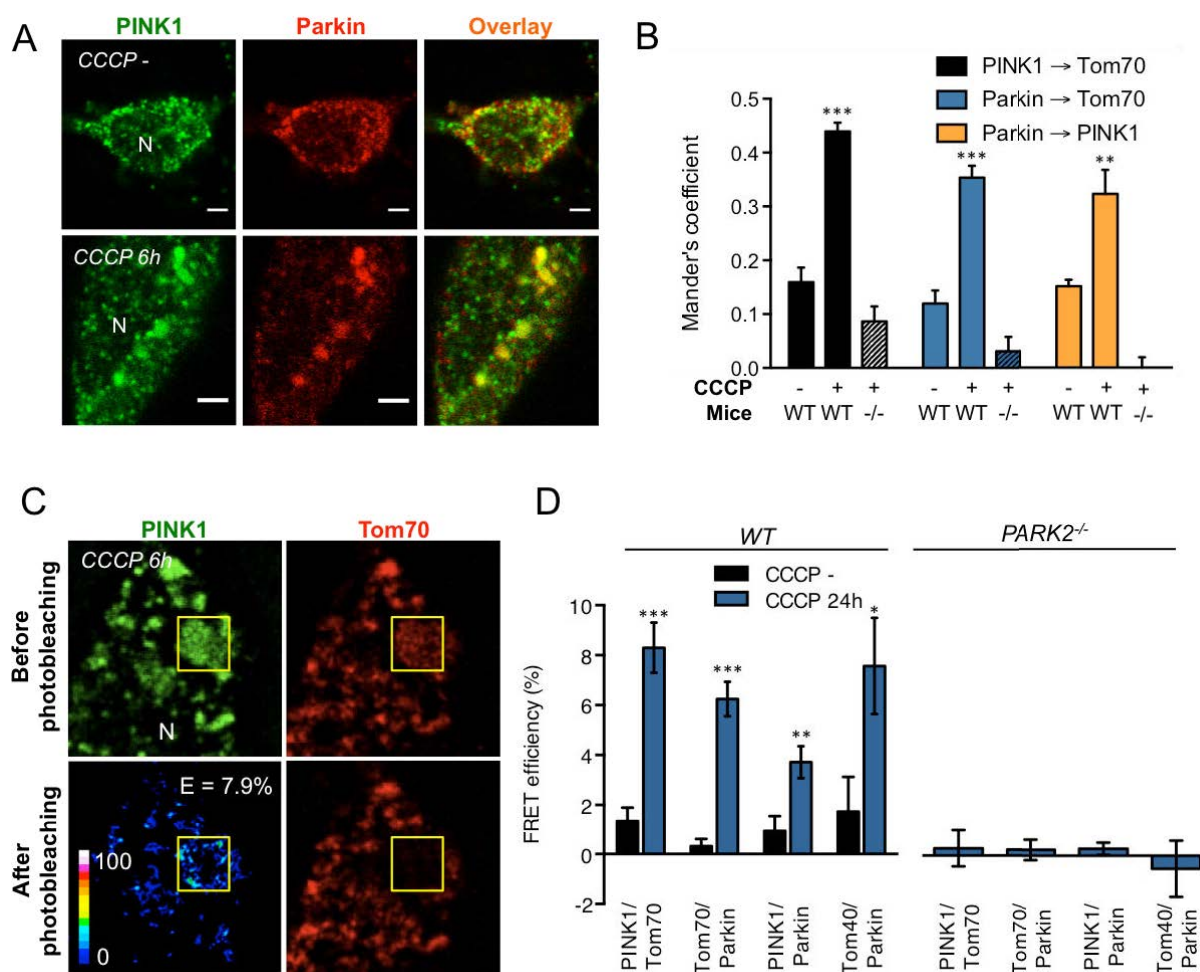


Figure 1 PINK1 est stabilisée à la mitochondrie par la Parkine et permet son recrutement à proximité de la machinerie TOM

(A) Images représentatives prises au microscope confocal illustrant l'immunomarquage de PINK1 et Parkine dans des neurones corticaux de souris sauvages traitées ou non par le CCCP pendant 6h. (B) Analyses quantitatives du coefficient de Mander pour les différentes conditions testées. $n = 20$ cellules par condition. (C) Proximités moléculaires testées par FRET entre les protéines endogènes PINK1 et Tom70. Les efficacités de FRET reflétant le changement de fluorescence des pixels du donneur (vert) après photoblanchiment de l'accepteur (rouge) dans la région d'intérêt (carré jaune) sont montrées en échelle de pseudo-couleur. (D) Analyses quantitatives des efficacités de FRET obtenues pour les différentes paires testées. $n > 15$ cellules issues de trois expériences indépendantes. Bar d'erreur : $2 \mu\text{m}$. WT : wild type. $-/-$: *PARK2*^{-/-}. E : efficacité moyenne de FRET. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La mitophagie Parkine-dépendante existe dans les neurones

Comme nous l'avons mentionné dans la partie introductive, un stress mitochondrial massif, induit le recrutement de PINK1 et Parkine, conduisant à la dégradation spécifique des mitochondries dysfonctionnelles par autophagie (Paragraphe III.3.e.5). Par l'utilisation d'une méthode permettant de quantifier

précisément la surface cellulaire occupée par les mitochondries sur des images prises sur un microscope confocal, nous montrons qu'un traitement par le CCCP induit dans des neurones sauvages une perte importante de l'immunomarquage pour les marqueurs des différents compartiments mitochondriaux (Tom70 et Tom40 pour la MME ; le cytochrome *c* pour l'espace inter-membranaire ; MPP β pour la matrice) (**Figure 2A,B**). Comme attendu sur la base des travaux de Chan *et al.*, et de Yoshii *et al.*, le récepteur Tom70 disparaît plus rapidement que les autres marqueurs et l'absence de Parkine abolit ou ralentit très fortement leur clairance [Chan *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011].

Afin de vérifier si cette dégradation mettait en jeu le lysosome, nous avons *down-régulé* *ATG7*, un acteur clé au processus d'autophagie. Cela a abolit l'effet du CCCP sur la dégradation du cytochrome *c*, mais non de Tom70, en accord avec les données de la littérature montrant que les protéines de la MME, y compris certaines sous-unités de la machinerie TOM sont dégradées par le protéasome (**Figure 2C,D** et **Paragraphe III.3.d**).

Un stress mitochondrial déclenche différents types de réponses protectrices, dont la mitophagie, la biogenèse mitochondriale, l'UPR^{mt} et la réponse antioxydante

La mitophagie n'est pas la seule réponse cellulaire mise en place par la cellule lors d'un stress mitochondrial. Elle fait en réalité partie intégrante d'un ensemble de réponses plus globale, incluant entre autres les réponses antioxydantes, les réponses de type UPR^{mt} (*Unfolded Protein Response, mitochondrial*), la biogenèse mitochondriale et la survie cellulaire. Dans le cadre de cette étude, nous avons lancé une large analyse de l'expression de gènes clés de ces différentes réponses par analyse par RT-PCR quantitative sur des neurones de souris sauvages et *PARK2*^{-/-}, soumis à un stress mitochondrial par le CCCP. Nous montrons qu'une grande partie de ces gènes sont plus exprimés après 24 heures de stress, et que cet effet est fortement diminué en absence de Parkine (**Annexe 2**, 24h).

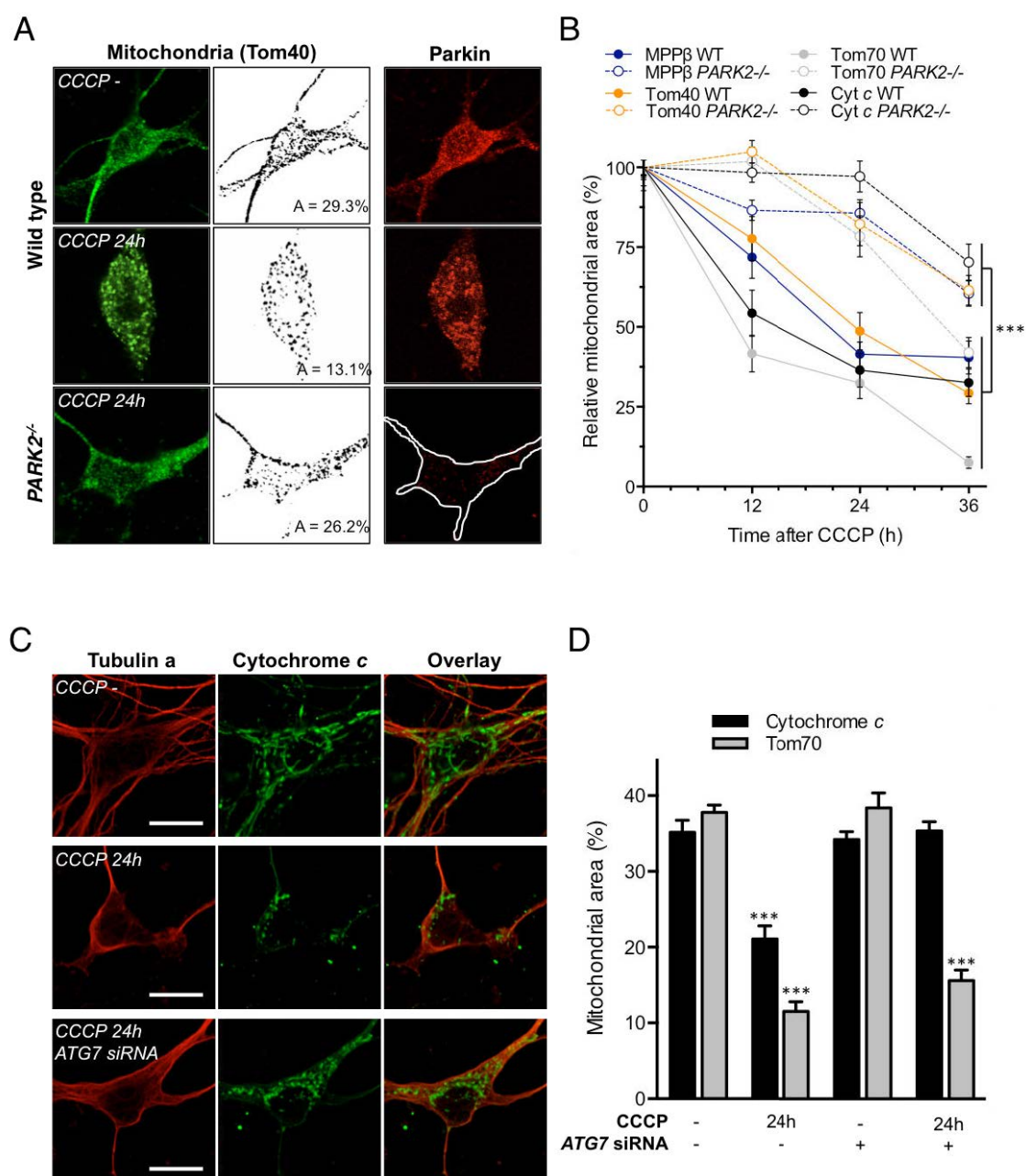


Figure 2 La mitophagie Parkine-dépendante existe également dans les neurones : une étude chez la souris sauvage et *PARK2*^{-/-}

(A) Images représentatives de microscopie confocale montrant une perte de l'immunomarquage Tom40 (panels de gauche, un filtre permettant d'enlever le bruit de fond a été utilisé pour obtenir les panels centraux) et l'immunomarquage de la Parkine (panels de droite) dans des neurones corticaux de souris traités ou non au CCCP pendant 6h. (B) Quantification de l'aire cellulaire occupée par des marqueurs mitochondriaux des différents compartiments (Tom70/Tom40, MME ; cytochrome c, espace intermembranaire ; MPPβ, matrice). (C) Images représentatives de microscopie confocale montrant une préservation du marquage du cytochrome c après un traitement au CCCP et la *down*-régulation d'*ATG7* dans des neurones corticaux murins. (D) Quantification de l'aire cellulaire occupée par le marqueur de l'espace inter-membranaire, cytochrome c et le marqueur de la MME, Tom70 dans les conditions indiquées. *** $p < 0.001$. A: aire mitochondriale relative (%). Bar d'erreur : 5 μ m

C'est par exemple le cas des gènes clés de la réponse antioxydante (*PRDX1*, *Peroxioredoxin 1* ; *TXN1*, *Thioredoxin 1* et *GPX2*, *Glutathion Peroxidase 2*), mais également de la réponse UPR^{mt} (*CHOP*, *C/EBP-Homologous Protein*; *PERK*, *PRKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase* ; *FOXO3*, *Forkhead Box O3*) (**Figure 3A**). De manière intéressante, nous montrons en utilisant la même approche et le même paradigme que les niveaux d'expression de base des gènes clés de la réponse antioxydante sont significativement diminués dans les neurones de souris *PARK2*^{-/-} en comparaison aux neurones de souris sauvages, alors que les niveaux d'expression des gènes de la réponse UPR^{mt} ne sont pas différents (**Figure 3B**).

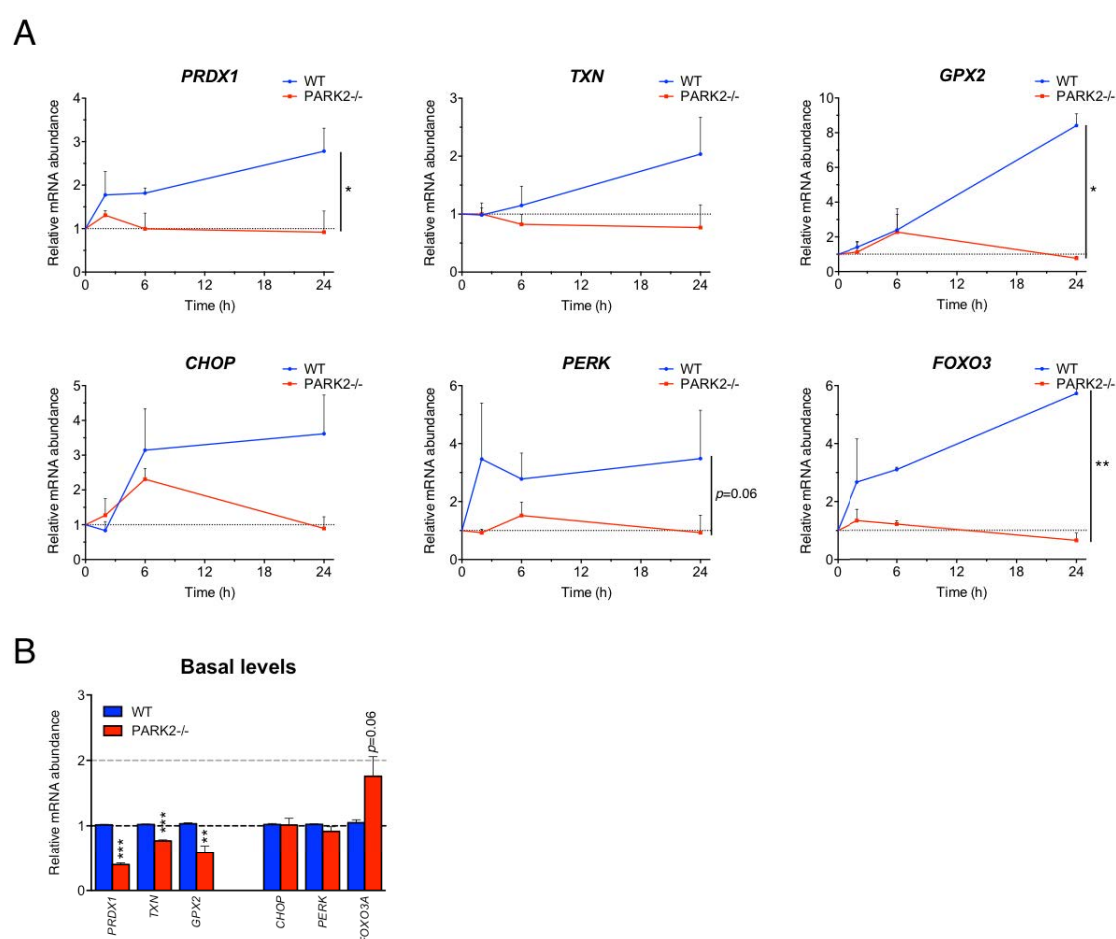


Figure 3 Un stress mitochondrial induit aussi une augmentation de la réponse antioxydante et de l'UPR^{mt}

(A) Analyse par RT-PCR quantitative montrant une augmentation au cours du temps de l'expression de gènes clés de la réponse antioxydante et de l'UPR^{mt} après un stress mitochondrial engendré par un traitement au CCCP dans des neurones sauvages, mais pas dans les neurones *PARK2*^{-/-}. (B) Analyse par RT-PCR quantitative des niveaux basaux de ces mêmes gènes dans les neurones de souris sauvages et *PARK2*^{-/-}. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Parmi les réponses mises en place par la cellule, la biogenèse mitochondriale est la réponse la plus modulée et altérée en absence de Parkine

Nous nous sommes en particulier intéressés à la biogenèse mitochondriale, dans laquelle la Parkine a déjà été proposée comme régulatrice de ce processus (**Paragraphe III.4**). Par l'étude de l'expression de gènes clés contrôlant l'initiation de la biogenèse mitochondriale par RT-PCR quantitative (*PGC-1 α* , *NRF1*, *NRF2*, *Tfam*, *SSBP1*), nous montrons que la majorité de ceux-ci sont plus exprimés après différents temps de traitement par le CCCP, et que cet effet n'est pas retrouvé en absence de Parkine (**Figure 4A**). L'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales (*TOM20*, *TOM40*, *TOM70* pour la machinerie TOM, mais aussi *VDAC1*, *MPP β* , *HSD17 β 10*) et de gènes mitochondriaux (*mt-CO1*, *mt-CO2*, *mt-ND1*, pour la chaîne respiratoire mitochondriale) tend également à être augmentée dans ce paradigme, en accord avec une induction de la biogenèse mitochondriale (**Annexe 2**, 24h).

De manière intéressante, le niveau d'expression basal de ces gènes est significativement plus élevé dans les neurones *PARK2^{-/-}*, ce qui suggère une dérégulation de base du processus de biogenèse mitochondriale en absence de Parkine (**Figure 4B**). Ces dérégulations apparaissent également au niveau protéique pour PGC-1 α et NRF1, dont les taux sont plus importants en l'absence de traitement chez les souris *PARK2^{-/-}* par rapport aux souris sauvages. De plus, pour PGC-1 α , nous observons que les niveaux protéiques restent relativement constant après un traitement par le CCCP dans les neurones sauvages, alors qu'une chute importante est observée dans les neurones *PARK2^{-/-}*. Dans le cas de NRF1 en revanche, nous observons une forte augmentation des niveaux protéiques suite au traitement dans les neurones sauvages qui n'est pas observée dans les neurones *PARK2^{-/-}* (**Figure 4C**).

Comme illustré dans la partie introductive, des études précédentes ont montré que la Parkine régule des mécanismes en lien avec la biogenèse mitochondriale (**Paragraphe III.4**) : (1) en favorisant la dégradation de PARIS, un régulateur négatif de PGC-1 α ; (2) en favorisant la dégradation d'hnRNP-F, un régulateur de la

biogenèse locale de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale codés par le génome nucléaire.

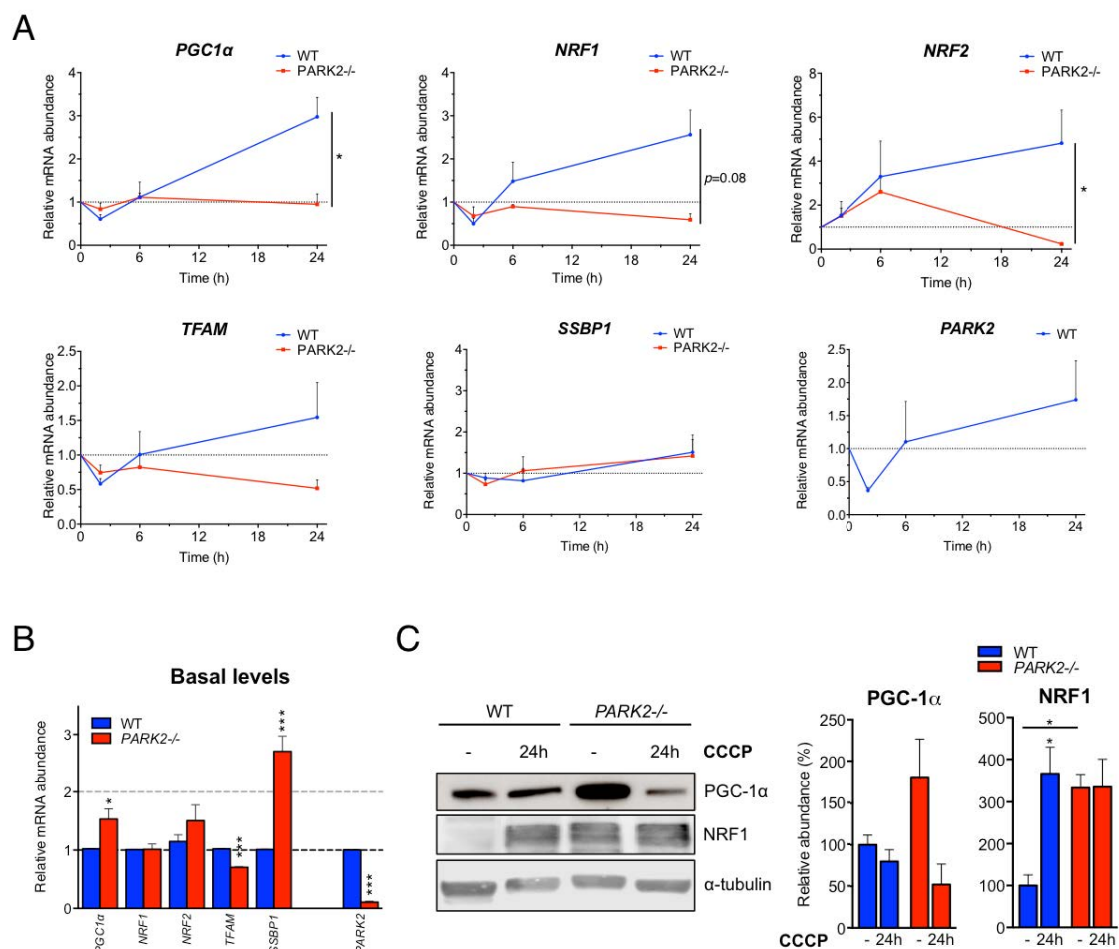


Figure 4 Un stress mitochondrial induit un déclenchement du processus de biogenèse mitochondriale ; cette réponse est altérée en l'absence de Parkine

(A) Analyse par RT-PCR quantitative montrant une augmentation au cours du temps de l'expression de gènes clés de la biogenèse mitochondriale après un traitement par le CCCP dans des neurones sauvages, mais pas dans les neurones *PARK2*^{-/-}. (B) Analyse par RT-PCR quantitative des niveaux de base de ces mêmes gènes dans les neurones de souris sauvages et *PARK2*^{-/-}. (C) Western blot représentatif et quantification des niveaux protéiques de PGC-1α et NRF1 montrant des dérégulations de niveaux de base et en réponse au CCCP. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

A travers l'étude par RT-PCR quantitative des gènes codants ces facteurs, nous mettons en évidence une augmentation significative de leur expression suite au traitement par le CCCP, uniquement dans les neurones sauvages (**Figure 5A**). Comme montré précédemment pour d'autres gènes contrôlant la biogenèse mitochondriale, le taux d'expression de PARIS est plus élevé au niveau basal dans les neurones *PARK2*^{-/-} (**Figure 5B**). L'étude par western blot des niveaux protéiques

montre un niveau basal d'hnRNP-F légèrement plus élevé dans les souris *PARK2*^{-/-}, ainsi qu'une augmentation de l'abondance d'hnRNP-F uniquement dans les neurones sauvages après 24 heures de CCCP (**Figure 5C**).

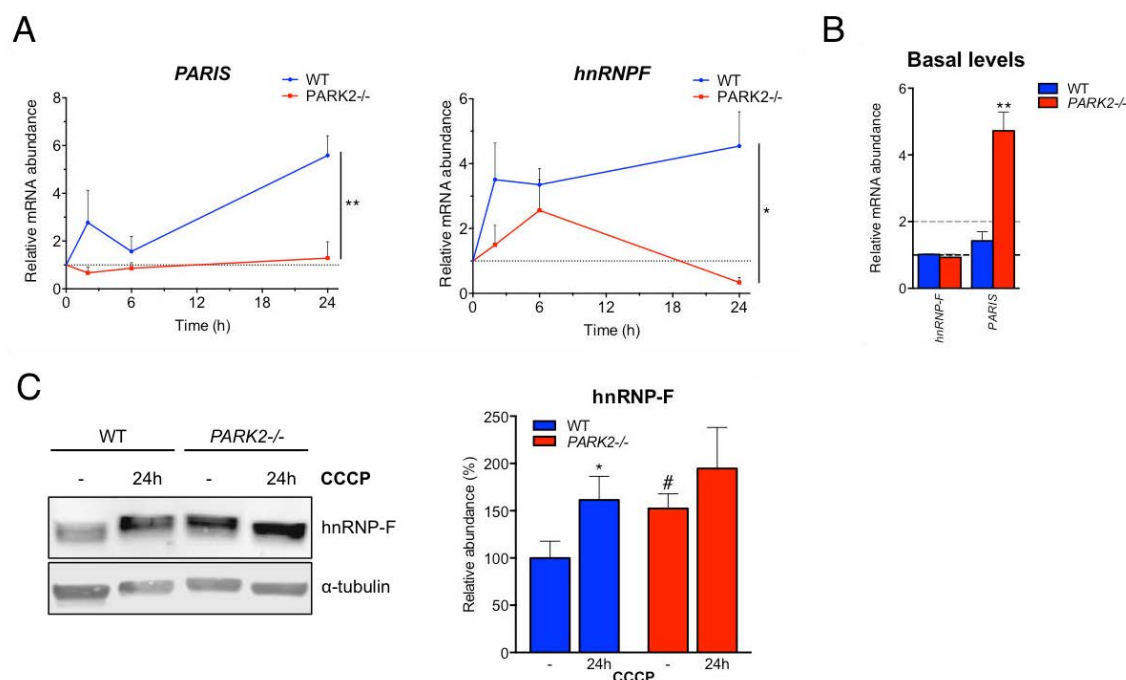


Figure 5 Un stress mitochondrial induit une augmentation de l'expression génique et protéique de PARIS et d'hnRNP-F

(A) Analyse par RT-PCR quantitative montrant une augmentation au cours du temps de l'expression de gènes PARIS et hnRNP-F après un stress mitochondrial par le CCCP dans des neurones sauvages, mais pas dans les neurones *PARK2*^{-/-}. (B) Analyse par RT-PCR quantitative des niveaux basaux de ces mêmes gènes dans les neurones de souris sauvages et *PARK2*^{-/-}. (C) Western blot représentatif et quantification des niveaux protéiques d'hnRNP-F. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. # $p < 0.05$, comparé au WT.

Les neurones *PARK2*^{-/-} sont plus vulnérables au stress mitochondrial que les neurones sauvages : rôle de la dysfonction de la mitophagie ?

Afin d'évaluer les conséquences de l'altération de la réponse au stress mitochondrial chez la souris *PARK2*^{-/-}, nous avons étudié comparativement la survie des neurones corticaux de souris sauvages ou *PARK2*^{-/-}, à différents temps après traitement par le CCCP, et cela jusqu'à 60 heures.

Pour cela, nous avons utilisé le système xCELLigence qui évalue la viabilité cellulaire en mesurant en temps réel l'impédance électrique (**Figure 6A**). Il apparaît que suite au traitement par le protonophore, une diminution progressive de l'index

normalisé d'impédance est observée pour les neurones sauvages et *PARK2*^{-/-}. Cette diminution est exacerbée en l'absence de Parkine.

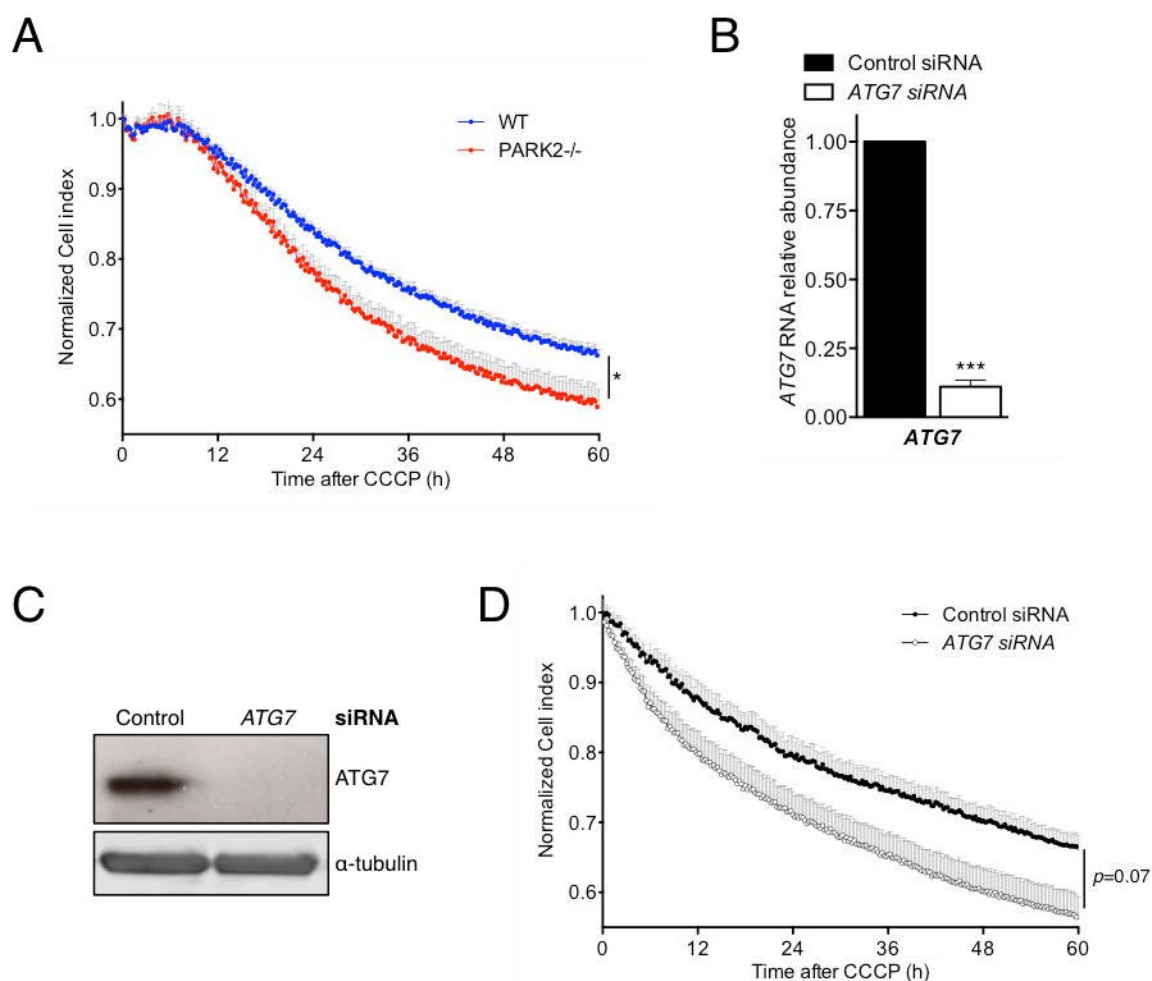


Figure 6 Analyse de la survie cellulaire en réponse au stress mitochondrial

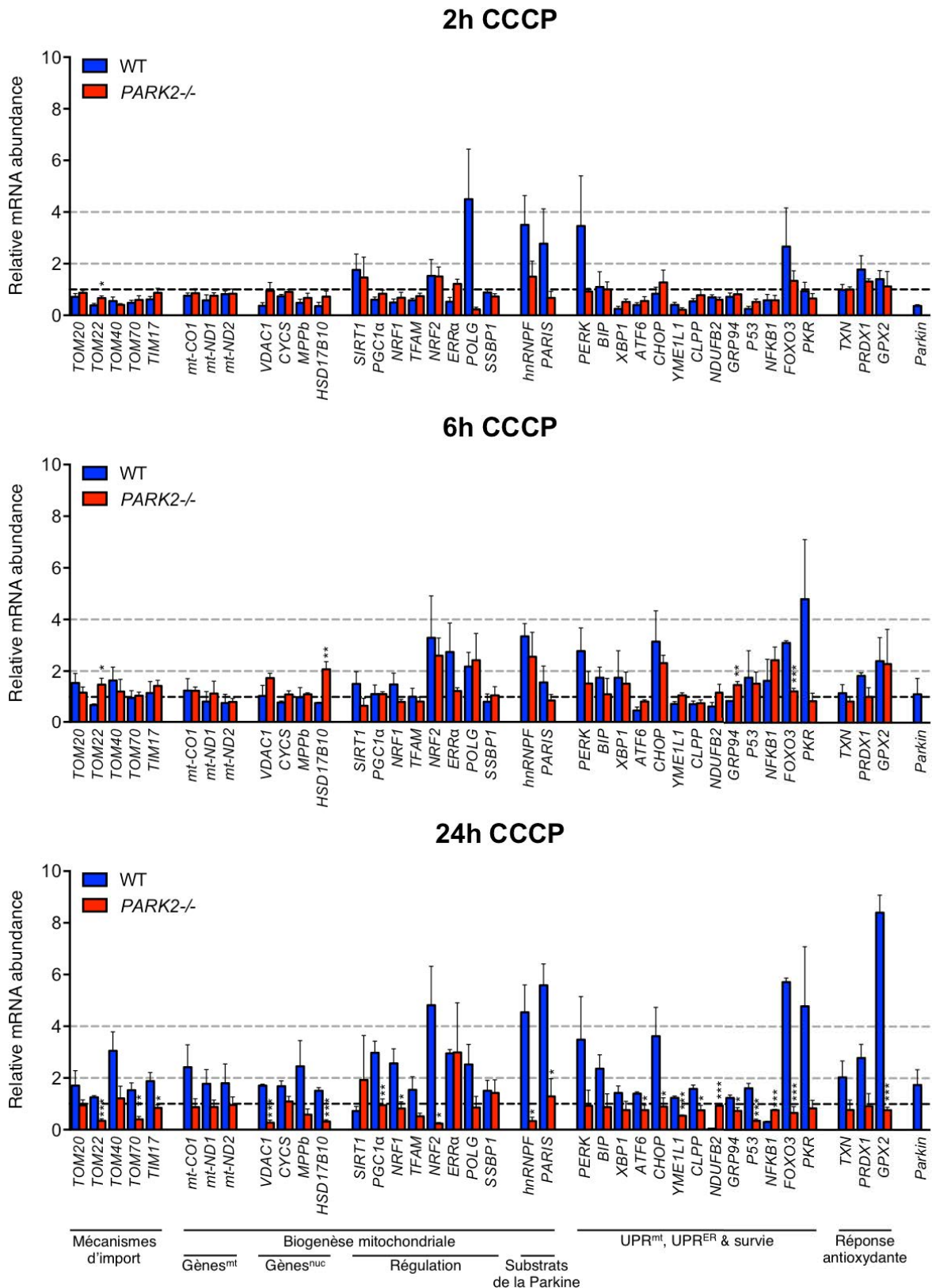
(A) Courbe de la viabilité cellulaire des neurones sauvages et *PARK2*^{-/-} après traitement au CCCP. (B-C) Validation de l'ARN interférent pour *ATG7* par RT-PCR quantitative et *western blot*. (D) Courbe de la viabilité cellulaire des neurones sauvages et *down-régulés* pour *ATG7*, après traitement au CCCP. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Afin d'étudier le rôle potentiel joué par l'altération de la mitophagie dans la vulnérabilité des neurones *PARK2*^{-/-} sous stress mitochondrial, nous avons développé des approches d'ARN interférence visant à éteindre l'expression d'*ATG7* dans les neurones (**Paragraphe II.7.a**). Nous avons tout d'abord testé son efficacité par RT-PCR quantitative et par *western blot* (**Figure 6B,C**). Dans une expérience préliminaire, nous avons étudié l'effet de cet ARN interférant sur la survie des neurones sauvages traités par le CCCP, et avons observé une tendance à

l'exacerbation de la mortalité similaire à celle constatée dans les neurones *PARK2*^{-/-} (**Figure 6D**).

Gene	Amorces sens	Amorces anti-sens
ATF6	5'-GGTGTGTCAGAGAACCAGAGGC-3'	5'-GCAGGGCTCACACTAGGTTT-3'
ATG7	5'-AGGCTGGCTGAGTCATCTGT-3'	5'-GGAGATCTTGGCGTTATCCA-3'
BiP	5'-TCAGCATCAAGCAAGGATTG-3'	5'-GCTTCATGGTAGAGCGGAAC-3'
CHOP	5'-CTGCCCAATTCCAGAATCAT-3'	5'-TGTAGGCTCTGCTTGGTGTG-3'
CLPP	5'-CTGCCCAATTCCAGAATCAT-3'	5'-TGTAGGCTCTGCTTGGTGTG-3'
CYCS	5'-CCAAATCTCCACGGTCTGTT-3'	5'-GTCTGCCCTTTCTCCCTTCT-3'
DDIT3	5'-CTGGAAGCCTGGTATGAGGA-3'	5'-GGACGCAGGGTCAAGAGTAG-3'
EIF2AK2	5'-AATGGTGTTCCTCCAGTCAGC-3'	5'-TTGCACATCATCAGGGGAT-3'A
EIF2AK3	5'-CGGATTCATTGAAAGCACCT-3'	ACGCGATGGGAGTACAAAAC-3'
ERRa	5'-GCAGTGGGAAGCTAGTGCTC-3'	5'-CGCTTGGTGATCTCACACTC-3'
FOXO3A	5'-GATAAGGGCGACAGCAACAG	5'-CCGTGCCTTCATTCTGAAC-3'
GPX2	5'-GGGCTGTGCTGATTGAGAA-3'	5'-GCTGTTCAGGATCTCCTCGT-3'
GRP94	5'-GTCGGGAAGCAACAGAGAAG-3'	5'-TGCCAGACCATCCATACTGA-3'
hnRNP-F	5'-CTCTCCGACTGCACAATTCA-3'	5'-TATACCGGTGTCCCATGCTT-3'
HSD17B10	5'-TCGCGGTAGTAACTGGAGGA-3'	5'-AGAGGTCACATTTGCTGGGG-3'
MPPB	5'-CTCGAGAGATTTGCCAGAG-3'	5'-TGATAGGCTGTCGCATGAAG-3'
mt-CO1	5'-TACCCACCTCTAGCCGGAAA-3'	5'-CTGTGTTATGGCTGGGGGTT-3'
mt-ND1	5'-GGCCATTTCGCGTTATTCTT-3'	5'-GCGTGGATAAGATGCTCGGA-3'
mt-ND2	5'-ATCCTCCTGGCCATCGTACT-3'	5'-ATGTGCAGTGGGATCCCTTG-3'
NDUFB2	5'-CAGGTGATCCAGGGTGAGTT-3'	5'-ATCAGGAGGGATTCCCAGTT-3'
NFKB1	5'-CACCTAGCTGCCAAAGAAGG-3'	5'-GCAGGCTATTGCTCATCACA-3'
NRF1	5'-AATGACCCAGGCTCAGCTTC-3'	5'-TTGCTCTTCTGTGCGGACAT-3'
NRF2	5'-GCAACTCCAGAAGGAACAGG-3'	5'-AGGCATCTTGTTTGGGAATG-3'
P53	5'-AACCGCCGACCTATCCTTAC-3'	5'-CTTCTGTACGGCGGTCTCTC-3'
PARIS	5'-AGTTGGACTCTGGAGCAGGA-3'	5'-GCTGCTGTGTTGAGCTTCAG-3'
PARK2	5'-GGCGGTCATTCTGGACACA-3'	5'-AACTCGGAGCTTTCCAGGC-3'
PGC1a	5'-AATGCAGCGGTCTTAGCACT-3'	5'-CTGAGCAGGGACGTCTTTGT-3'
POLG	5'-CCTTTGAGGTTTTCCAGCAG-3'	5'-TGTTCTGTGCCTCTGTCAGG-3'
PPIA	5'-AGCATACAGGTCCTGGCATC-3'	5'-CATGCCTTCTTTCACCTTCC-3'
PRDX1	5'-CTTCTGTCATCTGGCATGGA-3'	5'-AAAAAGGCCCTGAAAGAGA-3'
SIRT1	5'-AGTTCCAGCCGTCTCTGTGT-3'	5'-CTCCACGAACAGCTTCACAA-3'
SSBP1	5'-GTGGCGATCAGGGGATAGTG-3'	5'-ACGAGCCCCCTTTTTACAT-3'
TFAM	5'-AGGATGATTCCGGCTCAGGGA-3'	5'-GCCATCTGCTCTTCCCAAGA-3'
TIM17	5'-CTCCGAGGAAGTTTGACAGC-3'	5'-GCACCGCTAGTGATGGAGTT-3'
TOM20	5'-CGGAGTGACCCCAACTTCAA-3'	5'-CCACACACAGCAATGGCATT-3'
TOM22	5'-TAGACGAGACCCTGTCGGAG-3'	5'-GTCCCAATCCACAAAGCTGC-3'
TOM40	5'-TTTGGGGTCACATACGTGGG-3'	5'-CTGGGTCTGGATGGCCATTT-3'
TOM70	5'-AGCTGCTGCCTTTGAACAAT-3'	5'-GCATGCTCTGCTCATTTTGA-3'
TXN1	5'-TTCTCTGCTACGTGGTGTGG-3'	5'-CCCACCTTTTGACCCTTTTT-3'
VDAC1	5'-CGTGGACTGAAGCTCACCTT-3'	5'-AAGTTGCTCTGGGTCACTCG-3'
XPB1	5'-TCCGCAGCACTCAGACTATG-3'	5'-CCAGAATGCCCAAAGGATA-3'
YMEIL1	5'-CCGTATTCAAGGCAGACGAT-3'	5'-ATGCCTCTGGGAAATTTGTG-3'

Annexe 1 Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives



Annexe 2 Réponse au CCCP par RT-PCR quantitative

Analyse par RT-PCR quantitative montrant une modulation au cours du temps de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes d'import, de biogenèse mitochondriale, de l'UPR, de la survie et de la réponse antioxydante après un stress mitochondrial engendré par un traitement au CCCP.

Chapitre 5 : Discussion

Sur la base des données préliminaires de l'équipe et des données récentes de la littérature, les différents résultats obtenus lors de ma thèse nous permettent d'améliorer nos connaissances sur les rôles clés des protéines PINK1 et Parkine dans la physiologie de la cellule, et en particulier dans le contrôle de la qualité mitochondriale, ainsi que les conséquences de leur absence dans la pathophysiologie de la maladie de Parkinson.

Dans cette partie, je vais dans un premier temps résumer et discuter plus en détails certaines données clés obtenues tout au long de ces quatre années de thèse, puis dans un second temps discuter de points spécifiques récents et débattus liés au sujet, qui pourraient apporter une nouvelle vision plus physiologique des fonctions des protéines PINK1 et Parkine.

I. La machinerie TOM, un acteur central dans le contrôle de la qualité mitochondriale ?

1. Rôle de TOM dans la stabilisation de PINK1

Le transport des protéines à travers les membranes mitochondriales requiert une différence de potentiel de part et d'autre de la MMI, qui a deux rôles : un effet électrophorétique sur les séquences chargées positivement, permettant un ciblage à la matrice ; et l'activation de la sous-unité Tim23 de la translocase TIM23, en permettant sa dimérisation nécessaire à son interaction avec les séquences d'adressages mitochondriales [Geissler *et al.*, 2000] (**Paragraphe II.4**). Le traitement par le protonophore CCCP, très utilisé pour mettre en évidence les fonctions des protéines PINK1 et Parkine, est un ionophore permettant le transfert de protons à travers les bicouches lipidiques, ce qui résulte en une diminution du potentiel de membrane et par conséquent de l'import mitochondrial.

Par des approches de biochimie, nous montrons qu'un simple blocage de l'import mitochondrial, plus modéré que celui observé après un traitement par le

CCCP mais affectant aussi le $\Delta\Psi^{\text{mit}}$ est suffisant pour induire la stabilisation mitochondriale de PINK1 et un recrutement de la Parkine, ce qui suggère un couplage direct entre la perte de l'efficacité d'import et la mise en place du programme de dégradation mitochondriale. En effet, la *down*-régulation modérée par ARN interférence du canal Tom40 de la machinerie d'import mitochondrial TOM, ou le *silencing* de la protéase LONP1 impliquée dans la réponse à l'accumulation de protéines mal repliées dans la matrice stabilise PINK1 à la MME, recrute la Parkine et *in fine* induit une dégradation de protéines de la MME et de l'espace intermembranaire, qui est la première étape du processus de mitophagie (**Article 1, Figures 1/5**). En accord avec nos observations, Jin *et al.* ont montré en 2013 qu'une augmentation de l'expression de protéines mal repliées dans la matrice induisait une accumulation de PINK1 au niveau de mitochondries saines, ce qui résultait en la translocation de Parkine, une mitophagie et une diminution de la quantité de ces protéines mal repliées [Jin *et al.*, 2013]. Le *knockdown* de LONP1 induisait de la même manière une accumulation de PINK1. Egalement, Greene *et al.*, indiquent qu'une *down*-régulation de la protéase matricielle MPP β impliquée dans le clivage des MTS des protéines adressées conduit à un blocage de l'import probablement en empêchant l'import de PINK1, ce qui induit le recrutement de la Parkine à la MME, mais sans perte du $\Delta\Psi^{\text{mit}}$ [Greene *et al.*, 2012]. Dans nos mains, la *down*-régulation de MPP β ne conduit cependant ni à la dégradation de composant de la MME, ni au processus de mitophagie (**Article 1, Figure 6**). Dans une autre étude, nous montrons qu'une surproduction de l'enzyme matricielle HSD17 β 10 conduit à un recrutement massif de PINK1 à la mitochondrie (**Article 2, Figure 2, Panel f**), ce qui peut laisser penser que la surexpression d'une protéine mitochondriale pourrait saturer le canal Tom40 et ainsi créer un modèle de blocage de l'import.

Dans ces mêmes études, nous montrons que le recrutement de PINK1 et Parkine à la MME a lieu spécifiquement à proximité du complexe mitochondrial d'import TOM, aussi bien au niveau de mitochondries saines (**Article 2, Figure 4**), qu'endommagées (**Article 1, Figure 2**). Ces résultats, que nous avons validés plus récemment dans des cultures primaires de neurones murins (**Article 5, Figure 1**) sont soutenus par le fait que la machinerie TOM est une des premières cibles de la

Parkine au niveau de la MME [Chan *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011], mais aussi par le fait que Tom70 interagit directement (**Article 1, Figure S2**) et est ubiquitylé par la Parkine lors d'un traitement par le CCCP [Okatsu *et al.*, 2012 ; Sarraf *et al.*, 2013]. En accord avec ces résultats, les travaux de l'équipe de Richard Youle avaient déjà démontré quelques mois auparavant que lors d'un stress par le CCCP, PINK1 était retrouvée dans un complexe multiprotéique qui contenait également Tom20. Ils n'avaient pas identifié la Parkine dans ce complexe, mais n'excluaient pas son éventuelle présence [Lazarou *et al.*, 2012][Lazarou *et al.*, 2012]. Il se peut en effet que l'interaction de la Parkine à la machinerie TOM soit transitoire et qu'à la différence de la technique de FRET qui apparaît plus robuste pour l'étude d'interactions transitoires, les conditions expérimentales mises en œuvre dans leur étude n'étaient pas suffisantes pour la mise en évidence de ce type d'interaction. Depuis ces deux études, un criblage entier du génome mettant en jeu des siARN a permis d'identifier des régulateurs de la mitophagie. Ceci a ainsi permis d'identifier la sous-unité Tom7 qui serait essentielle au recrutement de PINK1 [Hasson *et al.*, 2013]. Dans une autre étude, Okatsu *et al.* ont par la suite complété les résultats obtenus par Lazarou *et al.* et ont mis en évidence un supercomplexe de 850 kDa, contenant deux molécules de PINK1 phosphorylées au niveau de leur Ser402 ainsi que les sous-unités Tom20, Tom22 et Tom40 de la machinerie TOM. Ceci suggère ainsi que PINK1 doit se trouver sous forme dimérisée et phosphorylée au niveau de la machinerie TOM afin de recruter la Parkine [Okatsu *et al.*, 2013]. Plus récemment, Bingol *et al.* ont montré que lors d'un stress mitochondrial la Parkine, par sa fonction d'E3 protéine-ligase dégradait Tom20 et que déubiquityler cette sous-unité par la déubiquitylase USP30 abolissait cet effet [Birsa *et al.*, 2014]. Il a enfin été montré l'année dernière que la séquence d'adressage mitochondrial de PINK1, ainsi que son domaine transmembranaire (TMD) n'est pas nécessaire à sa stabilisation mitochondriale et au recrutement de la Parkine à la MME, alors que la présence d'un second signal d'adressage mitochondrial situé entre le MTS et le TMD, et d'un canal Tom40 fonctionnel le sont [Okatsu *et al.*, 2015]. Ceci confirme ainsi le rôle clé du complexe TOM dans l'adressage de PINK1 à la MME lorsque la protéine n'est plus importée dans la matrice, ainsi que dans le recrutement mitochondrial de la Parkine.

2. Rôle de TOM dans la mitophagie

Nous montrons également dans notre étude que la dégradation spécifique par interférence à l'ARN de composants de la machinerie TOM est suffisante pour induire une clairance mitochondriale, même en absence de PINK1. Ceci suggère que ce complexe peut jouer un rôle d'interrupteur moléculaire entre la voie PINK/Parkine et le déclenchement du processus de dégradation des mitochondries. En effet, nos résultats démontrent que la dégradation protéolytique du complexe TOM serait suivie du recrutement de Parkine et agirait en tant qu'activateur moléculaire, initiant la dégradation de protéines de la MME et de l'espace intermembranaire, l'étape précédant le processus de mitophagie (**Article 1, Figure 5**). Ce résultat est discuté car Lazarou *et al.*, montrent que PINK1, délétée pour sa séquence d'adressage mitochondrial et dirigée à la MME par une ancre mitochondriale artificielle, est capable d'initier le recrutement de la Parkine, puis d'induire la mitophagie, sans interagir avec la machinerie TOM [Lazarou *et al.*, 2012].

II. La Parkine protège-t-elle la mitochondrie à travers son interaction avec l'enzyme mitochondriale HSD17 β 10 ?

1. HSD17 β 10, une enzyme mitochondriale multifonctionnelle protectrice

HSD17 β 10 est une enzyme mitochondriale, membre de la superfamille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne, importée à travers la machinerie TOM [He *et al.*, 2001]. Elle est essentielle au maintien de la fonction mitochondriale et de la viabilité cellulaire car son absence dans les cellules de souris conduit à une dysfonction de la structure, de la fonction et de la dynamique des mitochondries [Rauschenberger *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2005]. HSD17 β 10 avait déjà été identifiée comme protectrice dans un modèle murin contre une réponse apoptotique causée par l'intoxication par le MPTP, une toxine connue pour altérer la respiration mitochondriale [Tieu *et al.*, 2004]. Les auteurs ont montré dans cette étude que les souris surexprimant cette enzyme étaient significativement plus résistantes que les

souris sauvages à une intoxication par le MPTP et que ce rôle protecteur passerait par une atténuation de l'effet du MPTP sur l'altération de la phosphorylation oxydative et sur la production d'ATP.

HSD17 β 10 est une enzyme impliquée dans le catabolisme de l'isoleucine, où elle permet de déshydrogéner la MHB (2-méthyl-3-hydroxy-butyryl-CoA) [Zschocke, 2012] ; mais elle a aussi d'autres substrats, dont les acides gras et les stéroïdes neuroactifs [Yang *et al.*, 2009]. C'est également l'une des trois protéines composant le complexe *RNAse P* mitochondriale humaine, un complexe requis pour le « *processing* » des transcrits d'ADN^{mt} [Holzmann *et al.*, 2008]. Des mutations du gène *HSD17B10* sont à l'origine de pathologies rares, existant sous des formes néonatales et infantiles associées à une neurodégénérescence rapide et progressive, des formes juvéniles atypiques et aussi des formes asymptomatiques [Zschocke, 2012 ; Zschocke *et al.*, 2000]. Cette protéine aurait également un rôle dans les maladies neurodégénératives, comme dans la maladie d'Alzheimer où elle servirait de médiatrice dans la toxicité de la β -amyloïde [Lustbader *et al.*, 2004 ; Yan *et al.*, 1997], et dans la maladie de Parkinson où nous savons qu'elle est diminuée dans le mésencéphale ventral de patients parkinsoniens [Tieu *et al.*, 2004]. De plus, nous pouvons noter qu'en condition normale, ses transcrits sont abondants dans différents noyaux gris centraux et dans les régions cérébrales enrichies en neurones dopaminergiques [Hawrylycz *et al.*, 2012], ce qui soutient sa probable fonction essentielle au niveau de ces neurones, avec une implication majeure dans la préservation de la physiologie mitochondriale.

2. Parkine versus HSD17 β 10

Dans une étude publiée en 2015, nous montrons qu'HSD17 β 10 est *up*-régulée dans le cortex et le striatum de souris déficientes en Parkine, ainsi que dans le cortex de patients parkinsoniens. *A contrario*, elle est diminuée dans des fractions mitochondriales de cerveaux de souris (**Article 2, Figure 1, Panels a/b**). Par une approche de *GST-pulldown*, nous montrons qu'HSD17 β 10 est un substrat ubiquitylé par la Parkine, ce qui a été par la suite confirmé dans une étude utilisant de la spectrométrie de masse pour identifier des cibles de la Parkine [Sarraf *et al.*, 2013].

Par l'utilisation de la technique d'imagerie FRET, qui permet l'étude de proximité moléculaire *in cellulo*, nous montrons que la Parkine et HSD17 β 10 interagissent au niveau du complexe d'import TOM lors d'un stress mitochondrial (**Article 2, Figure 4**).

Contrairement à un nombre conséquent de substrats de la Parkine impliqués directement, ou indirectement dans le processus de mitophagie [Scarffe *et al.*, 2014] (**Paragraphe III.3.d**), nous proposons que la Parkine joue ici un rôle dans le maintien des quantités mitochondriales d'HSD17 β 10, probablement en facilitant son import. En effet, la *down*-régulation de Parkine et PINK1 par interférence à l'ARN dans des cellules HEK293T conduit à une diminution des taux de cette enzyme dans la fraction mitochondriale (**Article 5, Figure 2**). Deux interrogations clés découlent ainsi de ces résultats: (1) quelles sont les causes/conséquences de la facilitation de l'import d'HSD17 β 10 par la Parkine pour la cellule ? ; (2) quels sont les mécanismes mis en jeu par la Parkine pour faciliter l'import de cette protéine mitochondriale ?

3. HSD17 β 10 protège la cellule à travers son rôle dans l'hyperfusion mitochondriale

Nous confirmons dans notre étude le rôle protecteur d'HSD17 β 10, car sa surexpression protège la cellule contre une dépolarisation massive induite par le CCCP, et atténue la mitophagie dans ces cellules (**Article 2, Figures 5/7**). Nos données suggèrent que cette fonction passerait par son rôle clé dans l'élongation mitochondriale car la surexpression de cette protéine dans différentes lignées cellulaires induit une hyperfusion mitochondriale massive (**Article 2, Figure 6, Panel a**), possiblement en interférant avec la protéine pro-fission Drp1 (**Paragraphe II.3.b**). Notre hypothèse est soutenue par le fait qu'un changement drastique de la morphologie mitochondriale de ce type a déjà été mis en relation avec une optimisation de la production d'ATP dans des fibroblastes de souris [Gomes *et al.*, 2011 ; Rambold *et al.*, 2011 ; Tondera *et al.*, 2009], et que la surexpression d'HSD17 β 10 chez la souris préserve l'efficacité de production d'ATP contre une intoxication par le MPTP [Tieu *et al.*, 2004]. Il a aussi été proposé dans une étude sur des fibroblastes embryonnaires de souris que cette enzyme participerait à

l'activation de l'ATP synthase, également située à la MMI, et serait fortement activée dans des mitochondries allongées résistantes à une dégradation par autophagie [Gomes *et al.*, 2011].

III. L'import mitochondrial : une nouvelle voie de contrôle qualité mis en jeu par la Parkine ?

1. Développement d'un biosenseur de l'import mitochondrial

En se basant sur le fait que la Parkine permet de maintenir les taux mitochondriaux d'HSD17 β 10, et que Parkine, PINK1 et HSD17 β 10 se situent à proximité de la machinerie TOM, notre hypothèse était que la Parkine pourrait réguler l'import de cette protéine à travers la machinerie TOM, et d'une manière général l'import de l'ensemble des pré-protéines mitochondriales à signal d'adressage N-terminal synthétisées dans le cytoplasme.

Dans l'idée d'évaluer d'une manière plus directe cette hypothèse ainsi que les mécanismes mis en jeu, nous avons collaboré avec le laboratoire de Chémogénétique Servier dirigé par Denis Guedin afin de générer un biosenseur moléculaire inductible, qui à la particularité d'émettre un signal de bioluminescence uniquement lorsqu'il est importé dans la matrice mitochondriale (**Paragraphe Introductif Article 3**).

2. La Parkine facilite l'import mitochondrial des protéines à signal d'adressage N-terminal

Nous montrons dans notre étude que surexprimer la Parkine facilite l'import de ce biosenseur et qu'à l'inverse, *down-réguler* la Parkine le diminue. De manière intéressante, la surexpression de neuf mutants pathogéniques de la Parkine retrouvés chez des patients abolit l'effet observé avec la protéine normale (**Article 3, Figure 3**).

Afin d'être activée, la Parkine doit être phosphorylée par PINK1 sur sa Ser65 située dans le domaine UBL [Kondapalli *et al.*, 2012]. L'activation de cette protéine, couplée à la phosphorylation de l'ubiquitine par PINK1 va permettre l'ubiquitylation de substrats de la Parkine et au final d'induire la mitophagie [Kane *et al.*, 2014 ; Kazlauskaite *et al.*, 2014 ; Koyano *et al.*, 2014] (**Paragraphe III.3.c**). Sur la base de ces données clés, et du fait que nous avons montré par des tests *in vitro* qu'HSD17 β 10 doit être ubiquitylée par la Parkine à la MME afin d'être importée (**Article 2, Figure 2, Panel b**), nous avons soumis l'hypothèse que la Parkine pourrait faciliter l'import mitochondrial uniquement lorsque sa fonction d'ubiquitylation était possible. L'implication du processus d'ubiquitylation est soutenue par le fait que la dégradation cytosolique de protéines dirigées à l'espace intermembranaire (Cox12, Cox17, Mic17 et Pet191) par le système ubiquitine-protéasome régule la biogenèse de ces protéines [Bragoszewski *et al.*, 2013].

Dans notre étude, nous montrons que comme pour la mitophagie [Kane *et al.*, 2014 ; Kazlauskaite *et al.*, 2014 ; Kondapalli *et al.*, 2012 ; Koyano *et al.*, 2014], la Parkine et l'ubiquitine doivent être phosphorylées sur leur Ser65 afin de faciliter l'import mitochondrial du biosenseur (**Papier 3, Figure 3, Panels e/f**). Ceci suggère que cette nouvelle fonction de la Parkine met bien en jeu la fonction d'E3 ubiquitine-protéine ligase de la Parkine, en coopération avec PINK1, ainsi que la présence d'ubiquitines fonctionnelles. Egalement, la déubiquitylase USP30 de la MME a été montré comme antagonisant l'ubiquitylation de protéines au niveau des mitochondries dysfonctionnelles par la Parkine et de bloquer la mitophagie [Bingol *et al.*, 2014] (**Paragraphe III.3.e.δ**). Dans notre paradigme, la surproduction d'USP30 diminue l'import de notre rapporteur, aussi bien en présence qu'en absence de Parkine surexprimée, suggérant qu'USP30 neutralise également l'effet de la Parkine sur l'import mitochondrial.

Il semblerait ainsi que la Parkine, lorsqu'elle est activée, facilite plus généralement l'import de protéines à signal d'adressage N-terminal. D'autres études devront néanmoins être menées afin d'identifier les mécanismes précis par lesquels la Parkine contrôle l'import de ce rapporteur : est-ce en l'ubiquitylant directement, ou est-ce en ubiquitylant des récepteurs de la machinerie TOM, dont nous savons qu'il

s'agit des premières cibles du système marquées par l'ubiquitine lors d'une dysfonction mitochondriale ? [Chan *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011]. Mise à part une étude chez la levure, le rôle de l'ubiquitylation de ces récepteurs dans l'import mitochondrial n'a pas encore été étudié [Schmidt *et al.*, 2011]. Néanmoins, sur la base de ces observations faites par Chan *et al.* et Yoshii *et al.*, et du fait que la *down*-régulation de la sous-unité Tom70 induise une augmentation massive de l'import de notre biosenseur (**Article 3, Figure 2, Panel d**), nous proposons que c'est par la dégradation spécifique par ubiquitylation de cette sous-unité que la Parkine pourrait moduler le complexe TOM permettant une augmentation de l'import des protéines mettant en jeu la voie « Tom20 ». Cette hypothèse reste cependant à être confirmée, en mettant par exemple en jeu des expériences d'import *in vitro* qui pourraient être couplées à des tests d'ubiquitylation et/ou des approches de spectrométrie de masse pour identifier les protéines ubiquitylées par la Parkine lorsque notre biosenseur est surexprimé. De la même manière, des efforts restent à être fournis quant au développement d'un autre rapporteur, qui permettrait d'étudier l'autre voie majeure d'import mitochondrial, c'est-à-dire celle des protéines polytopiques hydrophobes adressées à la MMI (**Paragraphe II.4.2**).

L'utilisation de notre biosenseur nous a enfin permis d'identifier des défauts d'import dans des cultures primaires de fibroblastes humains issus de patients porteurs de mutations dans les gènes *PARK2* et *PINK1*, en comparaison à des individus contrôles (**Article 3, Figure 4**). De part sa simple utilisation en transfection transitoires et de son efficacité (ratio induit/non induit supérieur à 10 dans les fibroblastes), ce biosenseur pourra à terme être utilisé dans le cadre de criblages à haut débit afin d'identifier des molécules qui pourraient permettre de corriger les défauts d'import mis en évidence dans cette étude.

3. Les défauts d'import dans les maladies neurodégénératives

Ce n'est pas la première fois que des défauts de l'import mitochondrial sont reliés à la physiopathologie de maladies neurodégénératives. Il est en effet connu que Tom40 influence l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer, et des modifications de l'efficacité de l'import mitochondrial ont été rapportées dans

différentes maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Huntington et la maladie de Parkinson [Bender *et al.*, 2013 ; Devi *et al.*, 2006 ; Gottschalk *et al.*, 2014 ; Sokol *et al.*, 2014 ; Yano *et al.*, 2014] [Li *et al.*, 2010]. Une étude très récente montre également que la protéine fer-souffre mitochondriale Ndufs3 (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3*), faisant partie du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est significativement moins exprimée dans des neurones dopaminergiques de la substance noire de patients parkinsoniens sporadiques en comparaison à des individus sains, ce qui confirme l'existence de défauts d'import dans cette pathologie [Di Maio *et al.*, 2016]. Les auteurs montrent que chez ces patients, l' α -synucléine se lie dans ces conditions au récepteur Tom20, inhibant ainsi l'adressage des protéines mitochondriales.

4. Régulation spatio-temporelle de la traduction et de l'import des protéines mitochondriales

Comme mentionné dans la partie introductive, le protéome mitochondrial est composé de protéines codées par le génome nucléaire, traduites dans le cytosol, et qui doivent être importées à la mitochondrie, « processées », assemblées et dirigées dans leurs propres compartiments (**Paragraphe II.4**). L'abondance, la morphologie et les propriétés fonctionnelles des mitochondries sont finement régulées de manière à être spécifiques pour chaque type cellulaire et en fonction de leurs nécessités en terme de métabolisme. Il était ainsi assumé que cette régulation avait majoritairement lieu au niveau du noyau, par des mécanismes de régulations transcriptionnelles [Hock *et al.*, 2009]. Dans cette hypothèse, l'import mitochondrial avait simplement pour rôle de permettre l'adressage des protéines aux différents compartiments [Chacinska *et al.*, 2009]. Cependant, des études chez la levure et dans les cellules humaines HeLa ont mis au jour l'importance de processus précédant l'import [Fujiki *et al.*, 1993 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2004], et il est aujourd'hui clair que certaines protéines codées par le génome nucléaire peuvent être co-traductionnellement importées dans la mitochondrie [Lesnik *et al.*, 2015]. Des études transcriptomiques ont démontré que 50% des ARN messagers codant des protéines mitochondriales sont localisés à proximité de la mitochondrie. Ceci

implique une coopération fine entre des processus post-transcriptionnels gène-spécifiques et les machineries d'import mitochondrial. Dans ce sens, une étude a démontré le rôle de Tom20 dans le processus d'import co-translationnel, mettant en jeu la possibilité que l'import protéique puisse être modulé à travers une localisation précise de la localisation de l'ARN messenger et d'une traduction au niveau de sites spécifiques [Devaux *et al.*, 2010 ; Eliyahu *et al.*, 2010].

En plus de leur rôle dans la mitophagie, les protéines PINK1 et Parkine régulent également des aspects liés à la biogenèse mitochondriale dans des conditions physiologiques [Gehrke *et al.*, 2015 ; Shin *et al.*, 2011]. Le double rôle de ces protéines entre dégradation et biogenèse est par exemple bien illustré dans les études qui mettent en évidence la régulation de PINK1 et Parkine dans le recyclage sélectif de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale d'un coté et dans la dé-répression de la traduction d'ARN messagers de cette même chaîne respiratoire localisée à la MME d'un autre coté [Vincow *et al.*, 2013]. Ce dernier processus requiert l'association physique entre PINK1 et le récepteur Tom20 lors d'un import co-translationnel à travers la machinerie TOM. Il n'est pas exclu que ce mécanisme dépendant de PINK1 et Parkine joue un rôle plus général dans la facilitation de l'import mitochondrial que nous rapportons dans notre étude.

IV. La mitophagie n'est qu'un élément de la réponse mis en œuvre par la cellule lors d'un stress mitochondrial

1. Un traitement au CCCP induit une mitophagie dépendante de Parkine dans les neurones

Il a été rapporté que la Parkine a un potentiel protecteur face à différents types de stress cellulaires, tels que l'accumulation de protéines toxiques, l'excitotoxicité, ou le stress du réticulum endoplasmique [Bouman *et al.*, 2011 ; Imai *et al.*, 2000 ; Petrucelli *et al.*, 2002 ; Staropoli *et al.*, 2003]. Cependant, toutes ces réponses dans lesquelles la Parkine a été impliquée, y compris la mitophagie ont été

étudiées séparément, dans des modèles différents, avec des paradigmes différents. Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, j'ai réalisé une étude comparative intégrée de la réponse au stress mitochondrial dans un modèle neuronal issu de souris sauvages ou *PARK2*^{-/-}. A travers une analyse quantitative sur des images acquises en microscopie confocale de la surface cellulaire occupée par un marquage mitochondrial, nous avons tout d'abord montré que le traitement par le protonophore CCCP, communément employé pour étudier le contrôle de la qualité mitochondriale dans des lignées cellulaires [Pickrell *et al.*, 2015], induit aussi un recrutement de la Parkine au niveau de la machinerie TOM et une mitophagie dans des neurones embryonnaires de cortex murin. Ce résultat est important car l'existence d'une mitophagie dépendante de la Parkine dans les neurones reste débattue, probablement parce que les neurones sont très sensibles au CCCP et que les méthodes utilisées jusqu'alors ne sont pas assez sensibles (**Paragraphe IV.2**). Nous montrons également dans cette étude que la mitophagie est fortement diminuée dans les neurones *PARK2*^{-/-}, ce qui confirme un rôle clé de la Parkine dans ce mécanisme dans les neurones (**Article 5, Figures 1 et 2**).

2. Parkine et biogenèse mitochondriale

Nous avons par la suite choisi de réaliser dans ces mêmes modèles d'étude et paradigme une l'analyse transcriptionnelle à grande échelle de différents gènes clés impliqués dans plusieurs aspects de la réponse au stress, en nous focalisant tout particulièrement sur la biogenèse mitochondriale et sa régulation, sur la réponse antioxydante, sur l'UPR et sur la survie.

Une première observation marquante a été que plusieurs gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale étaient fortement induits dans les neurones *PARK2*^{-/-} en absence de stress. C'était le cas du canal Tom40 de la machinerie d'import TOM, de deux des trois sous-unités de la chaîne respiratoire étudiées, et du facteur PARIS, dont les niveaux d'expression étaient augmentés d'un facteur 4 par rapport aux neurones sauvages. Cette dernière observation peut paraître paradoxale si nous tenons compte du fait que PARIS est un répresseur transcriptionnel de PGC-1 α , et donc un régulateur négatif de la biogenèse mitochondriale [Shin *et al.*, 2011],

mais pourrait potentiellement s'expliquer par des cinétiques de réponses différentes ; elle ajoute aussi un élément supplémentaire de régulation par la Parkine, décrite pour contrôler les niveaux protéiques de PARIS directement [Shin *et al.*, 2011]. Il est important de noter que les niveaux protéiques de NRF1, PGC-1 α et hnRNP-F étaient augmentés dans les neurones *PARK2*^{-/-} en conditions basales, en accord avec les changements transcriptionnels. Quoi qu'il en soit, l'activation chronique de la voie de biogenèse mitochondriale dans des conditions basales chez la souris *PARK2*^{-/-} pourrait être le reflet d'un mécanisme compensatoire visant à préserver l'intégrité mitochondriale lorsque le contrôle de la qualité mitochondriale dysfonctionne. Bien qu'une dégénérescence neuronale n'ait pas été rapportée chez la souris *PARK2*^{-/-}, des signes de dysfonction mitochondriale ont été observés dans ce modèle, et en particulier des taux de respiration mitochondriale plus faibles dans le cerveau des souris *knockout* ont été décrits [Damiano *et al.*, 2014 ; Palacino *et al.*, 2004].

Une deuxième observation a été que dans les neurones sauvages, nous avons aussi constaté une augmentation significative de l'expression de la majorité des gènes étudiés reflétant la biogenèse mitochondriale suite au traitement par le CCCP. D'après les temps étudiés, cette réponse semble induite progressivement et avec un niveau d'activation maximal après 24h de traitement, et pourrait viser au renouvellement des mitochondries endommagées. Certaines de ces observations ont été confirmées au niveau protéique (PGC-1 α , NRF1, hnRNP-F). Ces changements d'expression génique et protéique étaient globalement absents dans les neurones *PARK2*^{-/-}. Cela pourrait refléter une altération de la réponse aigüe au stress, liée peut être à la dérégulation chronique de la voie de biogenèse mitochondriale en conditions basales. Il est à nouveau à souligner que le CCCP a induit à la fois des régulateurs positifs (PGC-1 α , NRF1/2, Tfam) et négatifs (hnRNPF, PARIS) de la biogenèse mitochondriale, ce qui suggère des boucles complexes de régulation. Comme discuté précédemment, il est possible que ces réponses aient des cinétiques différentes. L'ajout de nouveaux temps d'étude pourraient nous permettre de vérifier que nous ne sommes pas passé à coté d'éventuels pics majeurs de réponse. Couplés à l'existence d'une mitophagie dans les neurones, ces observations soutiennent l'hypothèse d'une co-régulation entre les

processus de biogenèse et de dégradation mitochondriales, où une bonne coordination entre ces deux processus serait essentielle (**Paragraphe II.7.c**). Même si les mécanismes impliqués dans cette balance ne sont pas encore réellement identifiés chez l'Homme, il est possible de rappeler l'existence chez *Caenorhabditis elegans* de facteur SKN-1, l'homologue de NRF2 qui est activé lors d'un stress oxydant en réponse à une dysfonction mitochondriale et qui contrôle l'expression de divers gènes de la biogenèse mitochondriale [Schmeisser *et al.*, 2013 ; Staab *et al.*, 2014].

3. Les autres réponses mises en place par la cellule lors d'un stress mitochondrial et contrôlées par la Parkine

Nos résultats ont aussi mis en évidence une augmentation de trois gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification suite au stress mitochondrial (*PDRX1*, *TXN* et *GPX2*) et de plusieurs gènes impliqués dans l'UPR^{ER} et dans l'UPR^{mt} uniquement dans les neurones sauvages (**Article 5, Annexe 1**). A la différence de la biogenèse mitochondriale, ces réponses ne sont pas modulées dans les neurones *PARK2*^{-/-} pour l'UPR et sont diminuées de façon chronique pour la réponse antioxydante, ce qui met en évidence un défaut de leur efficacité basale, pouvant expliquer l'absence de modulation de ces réponses lors d'un stress mitochondrial.

Ces résultats, couplés à ceux décrits chez *Caenorhabditis elegans* laissent penser qu'un facteur régulateur central de tous ces mécanismes, interagissant avec la Parkine, existerait. Chez le ver, c'est le facteur de transcription ATFS-1 qui semble jouer ce rôle, car lorsqu'il ne peut pas être importé à la mitochondrie, il va transloquer au noyau où il va permettre la transcription de gènes clés de nombreux processus essentiels à la viabilité cellulaire, tels que des protéases et des chaperonnes mitochondriales, des composants des machineries d'import, des gènes de la réponse antioxydante, mais également de l'immunité [Nargund *et al.*, 2012]. L'orthologue de ce facteur ne semble pas exister chez l'Homme mais il est très probable qu'un autre facteur possède aussi ce rôle d'intégrateur de différentes réponses protectrices mises en place par la cellule.

4. Rôle de la Parkine au-delà de la mitochondrie

De nombreux substrats mitochondriaux et non mitochondriaux de la Parkine ont été identifiés, dont certains avant la découverte de la fonction mitochondriale de la Parkine [Scarffe *et al.*, 2014]. C'est par exemple le cas de P38, de PARIS, de Pael ou de CDCrel-1 [Corti *et al.*, 2003 ; Imai *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2013 ; Shin *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2000]. En plus de la mitochondrie, la Parkine s'accumule au niveau de *Mycobacterium* intracellulaire *M. tuberculosis* afin d'induire son autophagie [Manzanillo *et al.*, 2013], ce qui lui confère un rôle protecteur face aux infections mycobactériennes. Lors de son ubiquitylome Parkine-dépendant publié en 2013, Sarraf *et al.* ont identifié un grand nombre d'interacteurs de la Parkine, dont beaucoup étaient ubiquitylés par celle-ci. Parmi les différentes protéines se trouve un nombre conséquent de protéines cytoplasmiques, dont les sous-unités du protéasome et des adaptateurs de l'autophagie (SQSTM1, CALCOCO2/NDP52 et TAX1BP1) [Sarraf *et al.*, 2013]. La Parkine doit être activée pour jouer son rôle d'ubiquitine-protéine ligases [Kondapalli *et al.*, 2012]. Pour ses substrats mitochondriaux, nous savons que l'ubiquitine phosphorylée par PINK1 est suffisante pour lier et activer la Parkine à la mitochondrie (**Paragraphe III.3.c**). PINK1 étant mitochondriale, le mécanisme d'activation de la Parkine permettant d'ubiquityler ses substrats non-mitochondriaux reste un mystère. La, ou les kinases non mitochondriales impliquées restent à être identifiées.

V. La mitophagie a-t-elle lieu dans des conditions physiologiques ?

1. Parkine et mitophagie : au delà du CCCP

Dans l'ensemble des expériences réalisées sur les lignées cellulaires, les neurones primaires, les cellules IPS (*Induced Pluripotent Stem cells*) différenciées en neurones, le déclenchement de la mitophagie dépendante des protéines PINK1 et Parkine a été réalisée par des traitements massifs tels que le protonophore

CCCP, l'inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale antimycine A (+/- oligomycine) ou le ionophore valinomycine [Ashrafi *et al.*, 2014 ; Rakovic *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2012]. Bien que plus difficilement quantifiable, cette voie existe également de manière constitutive sans perturbations chimiques. En utilisant la sonde Keima ciblant la mitochondrie et permettant d'étudier la mitophagie, Bingol *et al.* ont montré que ce phénomène se produisait sur une période de quelques jours dans des cultures primaires de neurones sans ajout de traitement dépolarisant, et qu'il était dépendant des protéines endogènes PINK1 et Parkine [Bingol *et al.*, 2014]. Vincow *et al.* montrent de leur côté que sans stress mitochondrial, la drosophile déficiente en Parkine présente un ralentissement significatif du *turnover* des protéines mitochondriales, similaire à celui observé chez la drosophile déficiente en Atg7, une protéine essentielle au processus de mitophagie, ce qui suggère que la voie PINK1/Parkine promeut la mitophagie *in vivo* [Vincow *et al.*, 2013].

Certains modèles de dysfonction mitochondriale mimant les processus pathophysiologiques défectueux mis en évidence dans les cellules en absence de PINK1 et Parkine montrent que le recrutement de la Parkine, parfois accompagné d'un déclenchement du processus de mitophagie, est également possible sans traitements pharmacologiques. Par exemple, la perte génétique des protéines profusion Mitofusine 1 et Mitofusine 2 conduit à une perte du potentiel de membrane mitochondrial, induisant un recrutement de la Parkine et une mitophagie [Chen *et al.*, 2005 ; Narendra *et al.*, 2008]. Dans cette même idée, nous montrons que la *down*-régulation du canal Tom40 de la machinerie TOM est de la même manière suffisante à induire le recrutement mitochondrial de la Parkine, ainsi que la dégradation de composants spécifiques de la MME [Bertolin *et al.*, 2013]. La Parkine est aussi recrutée au niveau des mitochondries dysfonctionnelles dans des neurones différenciés à partir d'IPS de patients atteints d'encéphalopathie mitochondriale, d'acidose lactique ou d'épisodes de type AVC (nommé syndrome MELAS) portant des mutations de l'ADN^{mt} [Hamalainen *et al.*, 2013]. Enfin, des mutations de l'ADN^{mt} sur la lignée cellulaire Cybrid montrent une mitophagie dépendante de PINK1 et Parkine, en présence de surexpression de Parkine ou lors de l'inhibition de mTOR,

un inhibiteur physiologique de l'autophagie [Gilkerson *et al.*, 2012 ; Suen *et al.*, 2010] (**Paragraphe II.7.a**). L'ensemble de ces résultats laisse penser que des dysfonctions mitochondriales causées par des mutations de l'ADN^{mt} pourraient, dans des conditions physiologiques, être à l'origine *in vivo* de la mise en place par la cellule de réponses protectives dépendantes de PINK1 et Parkine.

2. Importance *in vivo* des mécanismes de contrôle de la qualité mitochondriale

Après l'identification de formes autosomiques récessives dues à des mutations du gène *PARK2*, plusieurs laboratoires indépendants ont généré des modèles murins *knockout* pour ce gène et aucuns de ceux-ci ne présentaient de symptômes moteurs particuliers, et de perte de neurones dopaminergiques [Chesselet *et al.*, 2011 ; Itier *et al.*, 2003 ; Palacino *et al.*, 2004]. En 2011, Shin *et al.* ont développé un nouveau modèle murin, *knockout* conditionnel pour le gène *PARK2* au niveau du mésencéphale ventral, de manière à l'inactiver chez la souris adulte et surexprimant le répresseur transcriptionnel PARIS (*Parkin Interacting Substrate*). Ce modèle présente une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques dans cette région, accompagnée d'une surexpression de PARIS et d'une répression transcriptionnelle de son substrat, le facteur de transcription clé de la biogenèse mitochondriale PGC-1 α [Shin *et al.*, 2011]. Pickrell *et al.* ont également créé récemment un nouveau modèle murin de maladie de Parkinson en croisant une souris déficiente en Parkine avec la souris « Mutator », déficiente pour l'ADN polymérase mitochondriale POLG, et présentant des mutations de l'ADN^{mt} [Kujoth *et al.*, 2005 ; Pickrell *et al.*, 2015], à l'image des observations faites chez patients atteints de maladie de Parkinson (**Paragraphe I.1.d**). Les souris « Parkine/Mutator » résultant de ce croisement présentent des dégénérescences des neurones dopaminergiques, associées à des déficits moteurs, pouvant être compensés par la L-Dopa. Tout comme les souris « Mutator », elles présentent des mutations ponctuelles de l'ADN^{mt} mais beaucoup plus pathogènes, ainsi que des accumulations spécifiques d'ubiquitine phosphorylée dans les neurones. Ceci suggère que l'activation des protéines Parkine par PINK1 existe lors d'une dysfonction mitochondriale dans les neurones de souris [Pickrell *et al.*, 2015], créé ici

par la déficience de la polymérase POLG. Nous pouvons noter que les souris « Mutator » et les souris « Parkine/Mutator » ont une apparence normale hormis un poids légèrement plus faible chez les souris « Parkine/Mutator ».

Dans l'idée d'étudier *in vivo* les conséquences d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale sur la morphologie des mitochondries, ainsi que leur *turnover* dans les neurones dopaminergiques, une équipe a créé un modèle murin permettant l'étude de cette morphologie mitochondriale. Pour modéliser l'accumulation d'ADN^{mt} dans les neurones, ils ont utilisé la souris « MitoPark » *knockout* conditionnel pour le facteur de transcription Tfam [Ekstrand *et al.*, 2007], dont il est connu que la perte de fonction de Tfam résulte en la déplétion en ADN^{mt}, reliée à une déficience sévère de la chaîne respiratoire. Cette souris apparaît cependant en bonne santé à la naissance, mais développe une dégénérescence lente mais progressive des neurones dopaminergiques lorsqu'elle est adulte avec une perte de l'activité motrice [Ekstrand *et al.*, 2007 ; Galter *et al.*, 2010]. En utilisant cette souris, les auteurs montrent qu'une déficience de la chaîne respiratoire résulte en une fragmentation et une agrégation mitochondriale [Sterky *et al.*, 2011]. Cependant, ils ne mettent pas en évidence de recrutement de la Parkine au niveau mitochondrial, et l'absence de Parkine ne modifie pas l'aspect des mitochondries de la souris « MitoPark ». Le facteur de transcription Tfam étant un facteur clé au processus de biogenèse mitochondriale, il se peut que la Parkine n'ai pas les capacités de protéger/sauver les mitochondries qui ne peuvent répliquer leur ADN.

Ensemble, et en prenant également en compte l'étude de Vincow *et al.* mentionnée ci-dessus qui confirme l'existence d'une mitophagie dépendante de la Parkine *in vivo* chez la drosophile [Vincow *et al.*, 2013], ces résultats vont dans le sens d'une validation *in vivo* des processus de translocation mitochondriale et de mitophagie dépendants de la Parkine dans les neurones.

Chapitre 6 : Conclusion

Les formes familiales autosomiques de maladie de Parkinson représentent moins de 10% des cas cliniques. Depuis 20 ans, la découverte de gènes responsables de ces formes, ainsi que l'étude des fonctions des protéines qu'ils codent incluant PINK1 et Parkine, apportent un grand espoir, non seulement en améliorant nos connaissances des voies pathogéniques impliquées dans ces formes rares, mais aussi dans l'identification de marqueurs pathogéniques qui seraient en commun avec les formes sporadiques.

Des avancées majeures ont été réalisées ces dernières années quant à la compréhension du/des rôle(s) clé(s) de la voie PINK1/Parkine dans la régulation et la préservation de l'homéostasie mitochondriale. De plus, nous démontrons dans ces études une nouvelle fonction de cette voie, où la Parkine serait impliquée dans la facilitation de l'import mitochondrial des protéines à signal d'adressage N-terminal, dans des conditions physiologiques. Cependant, la preuve formelle d'un mécanisme d'action commun à l'ensemble des fonctions de cette voie manque, et l'orchestration spatio-temporelle des différents processus qu'elle régule reste mal comprise.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ouvrent dans ce sens de nouvelles perspectives sur le mode d'action de la voie PINK1/Parkine. En effet, nous montrons dans un modèle neuronal, plus pertinent que les cellules de lignées pour l'étude des fonctions de cette voie dans la maladie de Parkinson qu'un stress mitochondrial induit non seulement le processus de mitophagie mais également d'autres réponses (mitochondriales et non mitochondriales), telles que la biogenèse mitochondriales, l'UPR^{mt} et la réponse antioxydante. A l'image du facteur ATFS-1, suspecté jouer un rôle d'intégrateur des différentes réponses mises en place par les cellules chez *Caenorhabditis elegans*, il sera dans un avenir proche très important d'identifier le ou les facteurs qui pourraient jouer ce rôle chez l'Homme.

Ensemble, ces résultats obtenus, couplés avec ceux de la littérature, approfondissent notre connaissance des mécanismes moléculaires mis en jeu par la

voie PINK1/Parkine en apportant une meilleure compréhension des conséquences de la perte de fonction de cette voie, et permettent d'élargir notre compréhension de la physiopathologie des formes autosomiques récessives et possiblement des formes sporadiques de maladie de Parkinson.

Bibliographie

Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K *et al.* Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 2000; **100**: 551-560.

Abeliovich H, Zarei M, Rigbolt KT, Youle RJ *et al.* Involvement of mitochondrial dynamics in the segregation of mitochondrial matrix proteins during stationary phase mitophagy. *Nat Commun* 2013; **4**: 2789.

Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K *et al.* Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2112-2117.

Alim MA, Ma QL, Takeda K, Aizawa T *et al.* Demonstration of a role for alpha-synuclein as a functional microtubule-associated protein. *J Alzheimers Dis* 2004; **6**: 435-442; discussion 443-439.

Andres AM, Stotland A, Queliconi BB, Gottlieb RA. A time to reap, a time to sow: mitophagy and biogenesis in cardiac pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2015; **78**: 62-72.

Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, Blanchard-Fillion B *et al.* DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 14807-14812.

Ashrafi G, Schlehe JS, LaVoie MJ, Schwarz TL. Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J Cell Biol* 2014; **206**: 655-670.

Assous M, Had-Aissouni L, Gubellini P, Melon C *et al.* Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra. *Neurobiol Dis* 2014; **65**: 69-81.

Augustin S, Nolden M, Muller S, Hardt O *et al.* Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J Biol Chem* 2005; **280**: 2691-2699.

Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol* 2007; **17**: 456-464.

Baldelli S, Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K *et al.* The role of nNOS and PGC-1alpha in skeletal muscle cells. *J Cell Sci* 2014; **127**: 4813-4820.

Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, Ooi AG *et al.* A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* 2006; **126**: 995-1004.

Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 2011; **477**: 107-110.

Becker T, Bottinger L, Pfanner N. Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem Sci* 2012; **37**: 85-91.

Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, Kesavapany S *et al.* Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 5703-5708.

Belenguer P, Pellegrini L. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**: 176-183.

Benabid AL. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 2003; **13**: 696-706.

Bender A, Desplats P, Spencer B, Rockenstein E *et al.* TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by alpha-synuclein accumulation in Parkinson's disease. *PLoS One* 2013; **8**: e62277.

Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA *et al.* High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 2006; **38**: 515-517.

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K *et al.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 1973; **20**: 415-455.

Bertolin G, Ferrando-Miguel R, Jacoupy M, Traver S *et al.* The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. *Autophagy* 2013; **9**: 1801-1817.

Bertolin G, Jacoupy M, Traver S, Ferrando-Miguel R *et al.* Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-related enzyme 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 10. *Cell Death Differ* 2015; **22**: 1563-1576.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; **3**: 1301-1306.

Bingol B, Tea JS, Phu L, Reichelt M *et al.* The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature* 2014; **510**: 370-375.

Birsa N, Norkett R, Wauer T, Mevissen TE *et al.* Lysine 27 ubiquitination of the mitochondrial transport protein Miro is dependent on serine 65 of the Parkin ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2014; **289**: 14569-14582.

Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S *et al.* Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol* 2006; **60**: 557-569.

Bloom J, Pagano M. Experimental tests to definitively determine ubiquitylation of a substrate. *Methods Enzymol* 2005; **399**: 249-266.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O *et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; **299**: 256-259.

Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, Shan J *et al.* Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 769-782.

Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 1999; **52**: 1214-1220.

Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; **247 Suppl 2**: I13-10.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; **24**: 197-211.

Bragoszewski P, Gornicka A, Sztolsztener ME, Chacinska A. The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 2136-2148.

Brix J, Rudiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J *et al.* Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16522-16530.

Buhlman L, Damiano M, Bertolin G, Ferrando-Miguel R *et al.* Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 2012-2026.

Burbulla LF, Krebiehl G, Kruger R. Balance is the challenge--the impact of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Eur J Clin Invest* 2010; **40**: 1048-1060.

Cai Q, Zakaria HM, Simone A, Sheng ZH. Spatial parkin translocation and degradation of damaged mitochondria via mitophagy in live cortical neurons. *Curr Biol* 2012; **22**: 545-552.

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002; **415**: 92-96.

Calne DB. The free radical hypothesis in idiopathic parkinsonism: evidence against it. *Ann Neurol* 1992; **32**: 799-803.

Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R *et al.* The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 9103-9108.

Cassar M, Issa AR, Riemensperger T, Petitgas C *et al.* A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2015; **24**: 197-212.

Castrioto A, Lozano AM, Poon YY, Lang AE *et al.* Ten-year outcome of subthalamic stimulation in Parkinson disease: a blinded evaluation. *Arch Neurol* 2011; **68**: 1550-1556.

Caulfield TR, Fiesel FC, Moussaud-Lamodièrè EL, Dourado DF *et al.* Phosphorylation by PINK1 releases the UBL domain and initializes the conformational opening of the E3 ubiquitin ligase Parkin. *PLoS Comput Biol* 2014; **10**: e1003935.

Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T *et al.* Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 2009; **138**: 628-644.

Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J *et al.* Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* 2005; **120**: 817-829.

Chan EY. Regulation and function of uncoordinated-51 like kinase proteins. *Antioxid Redox Signal* 2012; **17**: 775-785.

Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ *et al.* Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 1726-1737.

Chance B, Williams GR, Hollunger G. Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. I. Effects of Amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methylene glycol. *J Biol Chem* 1963; **238**: 418-431.

Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; **280**: 26185-26192.

Cherra SJ, 3rd, Steer E, Gusdon AM, Kiselyov K *et al.* Mutant LRRK2 elicits calcium imbalance and depletion of dendritic mitochondria in neurons. *Am J Pathol* 2013; **182**: 474-484.

Chesselet MF, Richter F. Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol* 2011; **10**: 1108-1118.

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 1998; **12**: 2499-2509.

Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH *et al.* *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; **441**: 1162-1166.

Conn PJ, Battaglia G, Marino MJ, Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**: 787-798.

Cornelissen T, Haddad D, Wauters F, Van Humbeeck C *et al.* The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: 5227-5242.

Corral-Debrinski M, Blugeon C, Jacq C. In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7881-7892.

Correia Guedes L, Ferreira JJ, Rosa MM, Coelho M *et al.* Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; **16**: 237-242.

Corti O, Brice A. Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 2013; **23**: 100-108.

Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F *et al.* The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 1427-1437.

Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 2011; **91**: 1161-1218.

Costa AC, Loh SH, Martins LM. *Drosophila* Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e467.

Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, Tea JS *et al.* USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat Cell Biol* 2015; **17**: 160-169.

Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM. The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J* 2002; **21**: 942-953.

Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A *et al.* Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem* 2009; **284**: 13843-13855.

Dale RC, Church AJ, Surtees RA, Lees AJ *et al.* Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain* 2004; **127**: 21-33.

Damiano M, Gautier CA, Bulteau AL, Ferrando-Miguel R *et al.* Tissue- and cell-specific mitochondrial defect in Parkin-deficient mice. *PLoS One* 2014; **9**: e99898.

Damier P, Kastner A, Agid Y, Hirsch EC. Does monoamine oxidase type B play a role in dopaminergic nerve cell death in Parkinson's disease? *Neurology* 1996; **46**: 1262-1269.

Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C *et al.* Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 517-526.

Davidzon G, Greene P, Mancuso M, Klos KJ *et al.* Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann Neurol* 2006; **59**: 859-862.

de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A *et al.* Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology* 1995; **45**: 2143-2146.

Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S, Desmond H *et al.* PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 867-879.

Dehay B, Bourdenx M, Gorry P, Przedborski S *et al.* Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* 2015; **14**: 855-866.

Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 14503-14508.

Dettmer U, Newman AJ, Luth ES, Bartels T *et al.* In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of alpha-synuclein and beta-synuclein in neurons and non-neural cells. *J Biol Chem* 2013; **288**: 6371-6385.

Devaux F, Lelandais G, Garcia M, Goussard S *et al.* Posttranscriptional control of mitochondrial biogenesis: spatio-temporal regulation of the protein import process. *FEBS Lett* 2010; **584**: 4273-4279.

Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG *et al.* Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 2006; **26**: 9057-9068.

Dhungel N, Eleuteri S, Li LB, Kramer NJ *et al.* Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on alpha-synuclein. *Neuron* 2015; **85**: 76-87.

Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW *et al.* alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 342ra378.

Dikic I, Bremm A. DUBs counteract parkin for efficient mitophagy. *EMBO J* 2014; **33**: 2442-2443.

Durcan TM, Tang MY, Perusse JR, Dashti EA *et al.* USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J* 2014; **33**: 2473-2491.

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011; **331**: 456-461.

Ehse S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A *et al.* Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 2009; **187**: 1023-1036.

Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S *et al.* Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 1325-1330.

Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T *et al.* Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 284-294.

Endres M, Neupert W, Brunner M. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J* 1999; **18**: 3214-3221.

Ephraty L, Porat O, Israeli D, Cohen OS *et al.* Neuropsychiatric and cognitive features in autosomal-recessive early parkinsonism due to PINK1 mutations. *Mov Disord* 2007; **22**: 566-569.

Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 1901-1916.

Fiesel FC, Caulfield TR, Moussaud-Lamodièrre EL, Ogaki K *et al.* Structural and Functional Impact of Parkinson Disease-Associated Mutations in the E3 Ubiquitin Ligase Parkin. *Hum Mutat* 2015; **36**: 774-786.

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 259-272.

Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A *et al.* Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 2297-2310.

Fujiki M, Verner K. Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import in vivo. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1914-1920.

Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H *et al.* An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 4651-4659.

Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M *et al.* A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 2002; **51**: 296-301.

Galter D, Pernold K, Yoshitake T, Lindqvist E *et al.* MitoPark mice mirror the slow progression of key symptoms and L-DOPA response in Parkinson's disease. *Genes Brain Behav* 2010; **9**: 173-181.

Gandhi PN, Wang X, Zhu X, Chen SG *et al.* The Roc domain of leucine-rich repeat kinase 2 is sufficient for interaction with microtubules. *J Neurosci Res* 2008; **86**: 1711-1720.

Gandre-Babbe S, van der Blik AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 2402-2412.

Garcia M, Delaveau T, Goussard S, Jacq C. Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO Rep* 2010; **11**: 285-291.

Gaspar P, Ben Jelloun N, Febvret A. Sparing of the dopaminergic neurons containing calbindin-D28k and of the dopaminergic mesocortical projections in weaver mutant mice. *Neuroscience* 1994; **61**: 293-305.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M *et al.* Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 4861-4870.

Gehrke S, Wu Z, Klinkenberg M, Sun Y *et al.* PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane. *Cell Metab* 2015; **21**: 95-108.

Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 119-131.

Geisler S, Holmstrom KM, Treis A, Skujat D *et al.* The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 2010; **6**: 871-878.

Geissler A, Krimmer T, Bomer U, Guiard B *et al.* Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 3977-3991.

George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 1995; **15**: 361-372.

Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* 2007; **26**: 1913-1923.

Gilkerson RW, De Vries RL, Lebot P, Wikstrom JD *et al.* Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 978-990.

Gillardon F. Interaction of elongation factor 1-alpha with leucine-rich repeat kinase 2 impairs kinase activity and microtubule bundling in vitro. *Neuroscience* 2009; **163**: 533-539.

Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S *et al.* Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 1992; **69**: 809-822.

Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ *et al.* The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 223-232.

Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Mendez G, Eberl T *et al.* Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 1995; **27**: 583-596.

Goldsmith JR, Herishanu YO, Podgajetski M, Kordysh E. Dynamics of parkinsonism-Parkinson's disease in residents of adjacent kibbutzim in Israel's Negev. *Environ Res* 1997; **73**: 156-161.

Goldstein M, Lieberman A. The role of the regulatory enzymes of catecholamine synthesis in Parkinson's disease. *Neurology* 1992; **42**: 8-12; discussion 41-18.

Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 589-598.

Gottlieb RA, Stotland A. MitoTimer: a novel protein for monitoring mitochondrial turnover in the heart. *J Mol Med (Berl)* 2015; **93**: 271-278.

Gottschalk WK, Lutz MW, He YT, Saunders AM *et al.* The Broad Impact of TOM40 on Neurodegenerative Diseases in Aging. *J Parkinsons Dis Alzheimers Dis* 2014; **1**:

Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S *et al.* Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* 2012; **13**: 378-385.

Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA *et al.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 4078-4083.

Greggio E, Jain S, Kingsbury A, Bandopadhyay R *et al.* Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis* 2006; **23**: 329-341.

Grenier K, McLelland GL, Fon EA. Parkin- and PINK1-Dependent Mitophagy in Neurons: Will the Real Pathway Please Stand Up? *Front Neurol* 2013; **4**: 100.

Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J *et al.* Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 2010; **468**: 696-700.

Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D *et al.* Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995; **37**: 714-722.

Hamalainen RH, Manninen T, Koivumaki H, Kislin M *et al.* Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: E3622-3630.

Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A *et al.* Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 2059-2075.

- Hamza I, Dailey HA. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 1617-1632.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y *et al.* The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 2007; **282**: 37298-37302.
- Hanagasi HA, Lees A, Johnson JO, Singleton A *et al.* Smoking-responsive juvenile-onset Parkinsonism. *Mov Disord* 2007; **22**: 115-119.
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S *et al.* FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008; **181**: 497-510.
- Harbauer AB, Opalinska M, Gerbeth C, Herman JS *et al.* Mitochondria. Cell cycle-dependent regulation of mitochondrial preprotein translocase. *Science* 2014; **346**: 1109-1113.
- Harbauer AB, Zahedi RP, Sickmann A, Pfanner N *et al.* The protein import machinery of mitochondria—a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab* 2014; **19**: 357-372.
- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 774-785.
- Hasson SA, Kane LA, Yamano K, Huang CH *et al.* High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature* 2013; **504**: 291-295.
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH *et al.* An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 2012; **489**: 391-399.
- Haynes CM, Fiorese CJ, Lin YF. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends Cell Biol* 2013; **23**: 311-318.
- Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA *et al.* The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell* 2010; **37**: 529-540.
- He XY, Merz G, Yang YZ, Mehta P *et al.* Characterization and localization of human type10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 4899-4907.
- Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S *et al.* Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* 2009; **187**: 959-966.
- Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem* 2016;
- Hock MB, Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* 2009; **71**: 177-203.
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL *et al.* RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 2008; **135**: 462-474.
- Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS. Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem* 2009; **284**: 14978-14986.
- Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Michael McIntosh J *et al.* Nicotine is neuroprotective when administered before but not after nigrostriatal damage in rats and monkeys. *J Neurochem* 2009; **109**: 826-837.
- Ibanez P, Lesage S, Lohmann E, Thobois S *et al.* Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain* 2006; **129**: 686-694.
- Iguchi M, Kujuro Y, Okatsu K, Koyano F *et al.* Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 2013; **288**: 22019-22032.
- Imai Y, Gehrke S, Wang HQ, Takahashi R *et al.* Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J* 2008; **27**: 2432-2443.

Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N *et al.* An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001; **105**: 891-902.

Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 35661-35664.

Ishihara L, Warren L, Gibson R, Amouri R *et al.* Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. *Arch Neurol* 2006; **63**: 1250-1254.

Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 5360-5372.

Itakura E, Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Mizushima N. Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J Cell Sci* 2012; **125**: 1488-1499.

Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N *et al.* Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2277-2291.

Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N *et al.* The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 1995; **14**: 467-475.

Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 12017-12022.

Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 2010; **191**: 933-942.

Jin SM, Youle RJ. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy* 2013; **9**: 1750-1757.

Johnson BN, Berger AK, Cortese GP, Lavoie MJ. The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 6283-6288.

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2805-2812.

Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet* 2015; **386**: 896-912.

Kaltimbacher V, Bonnet C, Lecoivre G, Forster V *et al.* mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA* 2006; **12**: 1408-1417.

Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y *et al.* PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol* 2014; **205**: 143-153.

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 571-580.

Kazlauskaitė A, Kelly V, Johnson C, Baillie C *et al.* Phosphorylation of Parkin at Serine65 is essential for activation: elaboration of a Miro1 substrate-based assay of Parkin E3 ligase activity. *Open Biol* 2014; **4**: 130213.

Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, Campbell DG *et al.* Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J* 2014; **460**: 127-139.

Kim I, Lemasters JJ. Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; **300**: C308-317.

Kim KH, Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2014; **10**: 322-337.

Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009; **34**: 259-269.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; **392**: 605-608.

- Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI *et al.* PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2012; **2**: 120080.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB *et al.* Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 2008; **14**: 504-506.
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 2014; **510**: 162-166.
- Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C *et al.* Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 2006; **38**: 518-520.
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; **309**: 481-484.
- Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M *et al.* Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 883-895.
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 2007; **22**: 193-201.
- Langston JW, Ballard PA, Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 1983; **309**: 310.
- Lazarou M. Keeping the immune system in check: a role for mitophagy. *Immunol Cell Biol* 2015; **93**: 3-10.
- Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* 2012; **22**: 320-333.
- Lazarou M, Narendra DP, Jin SM, Tekle E *et al.* PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *J Cell Biol* 2013; **200**: 163-172.
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 2015; **524**: 309-314.
- Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL *et al.* Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* 2010; **189**: 671-679.
- Lee Y, Karuppagounder SS, Shin JH, Lee YI *et al.* Parthanatos mediates AIMP2-activated age-dependent dopaminergic neuronal loss. *Nat Neurosci* 2013; **16**: 1392-1400.
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000; **106**: 847-856.
- Lemay S, Chouinard S, Blanchet P, Masson H *et al.* Lack of efficacy of a nicotine transdermal treatment on motor and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; **28**: 31-39.
- Lesage S, Drouet V, Majounie E, Deramecourt V *et al.* Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet* 2016; **98**: 500-513.
- Lesnik C, Golani-Armon A, Arava Y. Localized translation near the mitochondrial outer membrane: An update. *RNA Biol* 2015; **12**: 801-809.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D *et al.* Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; **14**: 501-503.
- Li Q, Vande Velde C, Israelson A, Xie J *et al.* ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 21146-21151.

Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X *et al.* Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 1998; **273**: 34970-34975.

Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y *et al.* Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 2005; **64**: 1955-1957.

Lin MT, Cantuti-Castelvetri I, Zheng K, Jackson KE *et al.* Somatic mitochondrial DNA mutations in early Parkinson and incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 2012; **71**: 850-854.

Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W *et al.* Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet* 2012; **8**: e1002537.

Liu Z, Meray RK, Grammatopoulos TN, Fredenburg RA *et al.* Membrane-associated farnesylated UCH-L1 promotes alpha-synuclein neurotoxicity and is a therapeutic target for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 4635-4640.

Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 2013; **24**: 659-667.

Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1560-1567.

Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA *et al.* Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004; **364**: 875-882.

Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW *et al.* ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 2004; **304**: 448-452.

Lutz AK, Exner N, Fett ME, Schlehe JS *et al.* Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 2009; **284**: 22938-22951.

Ma Y, Hendershot LM. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 2001; **107**: 827-830.

MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T *et al.* The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* 2006; **52**: 587-593.

Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K *et al.* Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol* 1994; **36**: 876-881.

Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC *et al.* The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* 2013; **501**: 512-516.

Mao K, Klionsky DJ. Mitochondrial fission facilitates mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 2013; **9**: 1900-1901.

Mapa K, Sikor M, Kudryavtsev V, Waegemann K *et al.* The conformational dynamics of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Mol Cell* 2010; **38**: 89-100.

Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C *et al.* Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* 2002; **3**: 159-164.

Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988; **8**: 2804-2815.

Martin J, Mahlke K, Pfanner N. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18051-18057.

Martinus RD, Garth GP, Webster TL, Cartwright P *et al.* Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem* 1996; **240**: 98-103.

Mata IF, Taylor JP, Kachergus J, Hulihan M *et al.* LRRK2 R1441G in Spanish patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2005; **382**: 309-311.

Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y *et al.* Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 2006; **281**: 3204-3209.

Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010; **189**: 211-221.

Matsuda N, Tanaka K. Uncovering the roles of PINK1 and parkin in mitophagy. *Autophagy* 2010; **6**: 952-954.

Mayer A, Nargang FE, Neupert W, Lill R. MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J* 1995; **14**: 4204-4211.

McLean PJ, Kawamata H, Ribich S, Hyman BT. Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8812-8816.

McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, McBride HM *et al.* Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J* 2014; **33**: 282-295.

Meier S, Neupert W, Herrmann JM. Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J Cell Biol* 2005; **170**: 881-888.

Meisinger C, Ryan MT, Hill K, Model K *et al.* Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2337-2348.

Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, Selkoe DJ *et al.* The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J Neurochem* 2011; **117**: 856-867.

Melzer S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W *et al.* Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* 2013; **17**: 719-730.

Mendez I, Vinuela A, Astradsson A, Mukhida K *et al.* Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* 2008; **14**: 507-509.

Mezey E, Dehejia AM, Harta G, Tresser N *et al.* Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 1998; **3**: 493-499.

Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 634-646.

Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J *et al.* Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 2010; **30**: 4232-4240.

Mitsuoka T, Kaseda Y, Yamashita H, Kohriyama T *et al.* Effects of nicotine chewing gum on UPDRS score and P300 in early-onset parkinsonism. *Hiroshima J Med Sci* 2002; **51**: 33-39.

Molinari P, Casella I, Costa T. Functional complementation of high-efficiency resonance energy transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells. *Biochem J* 2008; **409**: 251-261.

Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H *et al.* Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998; **51**: 890-892.

Mortiboys H, Johansen KK, Aasly JO, Bandmann O. Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. *Neurology* 2010; **75**: 2017-2020.

Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJ, Klaffke S *et al.* Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann Neurol* 2008; **64**: 555-565.

Mukhopadhyay A, Ni L, Weiner H. A co-translational model to explain the in vivo import of proteins into HeLa cell mitochondria. *Biochem J* 2004; **382**: 385-392.

Munhoz RP, Wakutani Y, Marras C, Teive HA *et al.* The G2019S LRRK2 mutation in Brazilian patients with Parkinson's disease: phenotype in monozygotic twins. *Mov Disord* 2008; **23**: 290-294.

Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM *et al.* p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 2010; **6**: 1090-1106.

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; **183**: 795-803.

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010; **8**: e1000298.

Nargund AM, Fiorese CJ, Pellegrino MW, Deng P *et al.* Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol Cell* 2015; **58**: 123-133.

Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, Baker BM *et al.* Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* 2012; **337**: 587-590.

Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K *et al.* Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Neuron* 2010; **65**: 66-79.

Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**: 723-749.

Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R *et al.* Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 2008; **18**: 102-108.

Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 1985; **36**: 2503-2508.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V *et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; **299**: 896-899.

Niu J, Yu M, Wang C, Xu Z. Leucine-rich repeat kinase 2 disturbs mitochondrial dynamics via Dynamin-like protein. *J Neurochem* 2012; **122**: 650-658.

Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1356-1364.

Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 2010; **31**: 763-780.

Obata T. Role of hydroxyl radical formation in neurotoxicity as revealed by in vivo free radical trapping. *Toxicol Lett* 2002; **132**: 83-93.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 2010; **16**: 653-661.

Okatsu K, Iemura S, Koyano F, Go E *et al.* Mitochondrial hexokinase HK1 is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **428**: 197-202.

Okatsu K, Kimura M, Oka T, Tanaka K *et al.* Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *J Cell Sci* 2015; **128**: 964-978.

Okatsu K, Koyano F, Kimura M, Kosako H *et al.* Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J Cell Biol* 2015; **209**: 111-128.

Okatsu K, Uno M, Koyano F, Go E *et al.* A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J Biol Chem* 2013; **288**: 36372-36384.

Okun MS. Deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2012; **367**: 1529-1538.

Onoue K, Jofuku A, Ban-Ishihara R, Ishihara T *et al.* Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology. *J Cell Sci* 2013; **126**: 176-185.

Ordureau A, Heo JM, Duda DM, Paulo JA *et al.* Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: 6637-6642.

Ordureau A, Sarraf SA, Duda DM, Heo JM *et al.* Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell* 2014; **56**: 360-375.

Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 2010; **191**: 1141-1158.

Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA *et al.* A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 2008; **134**: 112-123.

Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; **44**: 595-600.

Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; **279**: 18614-18622.

Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS *et al.* MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 2011; **12**: 565-573.

Papa L, Germain D. Estrogen receptor mediates a distinct mitochondrial unfolded protein response. *J Cell Sci* 2011; **124**: 1396-1402.

Papa L, Germain D. SirT3 regulates the mitochondrial unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2014; **34**: 699-710.

Papkovskaia TD, Chau KY, Inesta-Vaquera F, Papkovsky DB *et al.* G2019S leucine-rich repeat kinase 2 causes uncoupling protein-mediated mitochondrial depolarization. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 4201-4213.

Parain K, Hapdey C, Rousselet E, Marchand V *et al.* Cigarette smoke and nicotine protect dopaminergic neurons against the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Parkinsonian toxin. *Brain Res* 2003; **984**: 224-232.

Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y *et al.* Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; **441**: 1157-1161.

Park S, Choi SG, Yoo SM, Son JH *et al.* Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy. *Autophagy* 2014; **10**: 1906-1920.

Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; **14**: 223-236; discussion 222.

Periquet M, Corti O, Jacquier S, Brice A. Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* 2005; **95**: 1259-1276.

Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N *et al.* Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; **126**: 1271-1278.

Pesah Y, Pham T, Burgess H, Middlebrooks B *et al.* *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 2004; **131**: 2183-2194.

Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M *et al.* Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 2002; **36**: 1007-1019.

Pickrell AM, Huang CH, Kennedy SR, Ordureau A *et al.* Endogenous Parkin Preserves Dopaminergic Substantia Nigral Neurons following Mitochondrial DNA Mutagenic Stress. *Neuron* 2015; **87**: 371-381.

Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 2015; **85**: 257-273.

Plowey ED, Cherra SJ, 3rd, Liu YJ, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2008; **105**: 1048-1056.

Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S *et al.* The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1243-1252.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; **276**: 2045-2047.

Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM *et al.* The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 1638-1643.

Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 2007; **5**: e172.

Prokisch H, Scharfe C, Camp DG, 2nd, Xiao W *et al.* Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* 2004; **2**: e160.

Quiros PM, Langer T, Lopez-Otin C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; **16**: 345-359.

Rainbolt TK, Atanassova N, Genereux JC, Wiseman RL. Stress-regulated translational attenuation adapts mitochondrial protein import through Tim17A degradation. *Cell Metab* 2013; **18**: 908-919.

Rakovic A, Shurkewitsch K, Seibler P, Grunewald A *et al.* Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)-dependent ubiquitination of endogenous Parkin attenuates mitophagy: study in human primary fibroblasts and induced pluripotent stem cell-derived neurons. *J Biol Chem* 2013; **288**: 2223-2237.

Ramachandiran S, Hansen JM, Jones DP, Richardson JR *et al.* Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol Sci* 2007; **95**: 163-171.

Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 10190-10195.

Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7585-7587.

Rauschenberger K, Scholer K, Sass JO, Sauer S *et al.* A non-enzymatic function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 is required for mitochondrial integrity and cell survival. *EMBO Mol Med* 2010; **2**: 51-62.

Rea SL, Majcher V, Searle MS, Layfield R. SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res* 2014; **325**: 27-37.

Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P *et al.* Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* 2003; **299**: 1747-1751.

Reid AH, McCall S, Henry JM, Taubenberger JK. Experimenting on the past: the enigma of von Economo's encephalitis lethargica. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 663-670.

Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C *et al.* Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* 2006; **5**: 1543-1554.

Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1824**: 22-33.

Riley BE, Loughheed JC, Callaway K, Velasquez M *et al.* Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat Commun* 2013; **4**: 1982.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005; **434**: 113-118.

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986; **234**: 364-368.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519-529.

Rothfuss O, Fischer H, Hasegawa T, Maisel M *et al.* Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 3832-3850.

Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci* 2015; **40**: 200-210.

Saint-Georges Y, Garcia M, Delaveau T, Jourden L *et al.* Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* 2008; **3**: e2293.

Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T *et al.* Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J* 2007; **26**: 4777-4787.

Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV. Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches. *Curr Pharm Des* 2014; **20**: 5619-5633.

Sandebing A, Thomas KJ, Beilina A, van der Brug M *et al.* Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. *PLoS One* 2009; **4**: e5701.

Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME *et al.* Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 2013; **496**: 372-376.

Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y *et al.* The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J* 2009; **28**: 1341-1350.

Sauve V, Lilov A, Seirafi M, Vranas M *et al.* A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *EMBO J* 2015; **34**: 2492-2505.

Saxton WM, Hollenbeck PJ. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 2012; **125**: 2095-2104.

Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci* 2014; **37**: 315-324.

Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 2008; **88**: 611-638.

Schafer FQ, Qian SY, Buettner GR. Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000; **46**: 657-662.

Schapira AH. Treatment options in the modern management of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2007; **64**: 1083-1088.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P *et al.* Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; **1**: 1269.

Schmeisser S, Schmeisser K, Weimer S, Groth M *et al.* Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension. *Aging Cell* 2013; **12**: 508-517.

Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eyrich B *et al.* Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* 2011; **144**: 227-239.

Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 655-667.

Shiba-Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, Inoshita T *et al.* Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004861.

Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y *et al.* PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep* 2012; **2**: 1002.

Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Shiono H. Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neurosci Res* 2003; **46**: 523-532.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; **25**: 302-305.

Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y *et al.* PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 2011; **144**: 689-702.

Shiota T, Imai K, Qiu J, Hewitt VL *et al.* Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* 2015; **349**: 1544-1548.

Simon DK, Lin MT, Zheng L, Liu GJ *et al.* Somatic mitochondrial DNA mutations in cortex and substantia nigra in aging and Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2004; **25**: 71-81.

Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL *et al.* Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 1231-1233.

Sokol AM, Sztolsztener ME, Wasilewski M, Heinz E *et al.* Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS Lett* 2014; **588**: 2484-2495.

Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, Braschi E *et al.* A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol* 2012; **22**: 135-141.

Soubannier V, Rippstein P, Kaufman BA, Shoubridge EA *et al.* Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS One* 2012; **7**: e52830.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M *et al.* alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 6469-6473.

Spina MB, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 1398-1400.

Sriram SR, Li X, Ko HS, Chung KK *et al.* Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 2571-2586.

Staab TA, Evgrafov O, Knowles JA, Sieburth D. Regulation of synaptic nlg-1/neuroigin abundance by the skn-1/Nrf stress response pathway protects against oxidative stress. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004100.

Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B *et al.* Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 2003; **37**: 735-749.

Sterky FH, Lee S, Wibom R, Olson L *et al.* Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 12937-12942.

Stolz A, Dikic I. PINK1-PARKIN interplay: down to ubiquitin phosphorylation. *Mol Cell* 2014; **56**: 341-342.

Su YC, Qi X. Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 4545-4561.

Suen DF, Narendra DP, Tanaka A, Manfredi G *et al.* Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 11835-11840.

Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* 2014; **33**: 2142-2156.

Sun Y, Vashisht AA, Tchieu J, Wohlschlegel JA *et al.* Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* 2012; **287**: 40652-40660.

Surmeier DJ, Schumacker PT. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2013; **288**: 10736-10741.

Tain LS, Mortiboys H, Tao RN, Ziviani E *et al.* Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci* 2009; **12**: 1129-1135.

- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 2010; **191**: 1367-1380.
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J *et al.* Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999; **281**: 341-346.
- Tatsuta T, Langer T. AAA proteases in mitochondria: diverse functions of membrane-bound proteolytic machines. *Res Microbiol* 2009; **160**: 711-717.
- Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; **1**: a009316.
- Tieu K, Perier C, Vila M, Caspersen C *et al.* L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase II protects in a model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; **56**: 51-60.
- Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M *et al.* SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 2009; **28**: 1589-1600.
- Trempe JF, Sauve V, Grenier K, Seirafi M *et al.* Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* 2013; **340**: 1451-1455.
- Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 2011; **14**: 1939-1951.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; **304**: 1158-1160.
- van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC *et al.* Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 1999; **401**: 485-489.
- Villafane G, Cesaro P, Rialland A, Baloul S *et al.* Chronic high dose transdermal nicotine in Parkinson's disease: an open trial. *Eur J Neurol* 2007; **14**: 1313-1316.
- Vincow ES, Merrihew G, Thomas RE, Shulman NJ *et al.* The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 6400-6405.
- Visanji NP, Mitchell SN, O'Neill MJ, Duty S. Chronic pre-treatment with nicotine enhances nicotine-evoked striatal dopamine release and alpha6 and beta3 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuropharmacology* 2006; **50**: 36-46.
- Vives-Bauza C, de Vries RL, Tocilescu M, Przedborski S. PINK1/Parkin direct mitochondria to autophagy. *Autophagy* 2010; **6**: 315-316.
- Vogtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D *et al.* Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 2009; **139**: 428-439.
- Wallace LM, Moreo A, Clark KR, Harper SQ. Dose-dependent Toxicity of Humanized Renilla reniformis GFP (hrGFP) Limits Its Utility as a Reporter Gene in Mouse Muscle. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; **2**: e86.
- Wang X, Chen XJ. A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature* 2015; **524**: 481-484.
- Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J *et al.* PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 2011; **147**: 893-906.
- Wang X, Yan MH, Fujioka H, Liu J *et al.* LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 1931-1944.
- Wang X, Zuo X, Kucejova B, Chen XJ. Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 1090-1097.
- Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA *et al.* ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* 2012; **8**: 1462-1476.

- Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *EMBO J* 2013; **32**: 2099-2112.
- Wauer T, Simicek M, Schubert A, Komander D. Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature* 2015; **524**: 370-374.
- Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, Gladkova C *et al*. Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *EMBO J* 2015; **34**: 307-325.
- Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR *et al*. Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 2009; **48**: 2045-2052.
- Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C *et al*. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem* 2007; **282**: 36642-36651.
- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 872-884.
- Westphal CH, Chandra SS. Monomeric synucleins generate membrane curvature. *J Biol Chem* 2013; **288**: 1829-1840.
- White R, Morganstein D, Christian M, Seth A *et al*. Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett* 2008; **582**: 39-45.
- Woodroof HI, Pogson JH, Begley M, Cantley LC *et al*. Discovery of catalytically active orthologues of the Parkinson's disease kinase PINK1: analysis of substrate specificity and impact of mutations. *Open Biol* 2011; **1**: 110012.
- Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I *et al*. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 2001; **263**: 107-117.
- Wrobel LJ, Le Gal FA. Inhibition of human melanoma growth by a non-cardioselective beta-blocker. *J Invest Dermatol* 2015; **135**: 525-531.
- Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B *et al*. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 2000; **19**: 1963-1973.
- Wu Z, Huang X, Feng Y, Handschin C *et al*. Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1alpha transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 14379-14384.
- Yamano K, Fogel AI, Wang C, van der Bliek AM *et al*. Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy. *Elife* 2014; **3**: e01612.
- Yamano K, Youle RJ. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* 2013; **9**: 1758-1769.
- Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X *et al*. An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1997; **389**: 689-695.
- Yang JY, Yang WY. Bit-by-bit autophagic removal of parkin-labelled mitochondria. *Nat Commun* 2013; **4**: 2428.
- Yang SY, He XY, Olpin SE, Sutton VR *et al*. Mental retardation linked to mutations in the HSD17B10 gene interfering with neurosteroid and isoleucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 14820-14824.
- Yang SY, He XY, Schulz H. Multiple functions of type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Trends Endocrinol Metab* 2005; **16**: 167-175.
- Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF *et al*. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 7070-7075.
- Yano H, Baranov SV, Baranova OV, Kim J *et al*. Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nat Neurosci* 2014; **17**: 822-831.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T *et al*. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; **107**: 881-891.

Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2011; **286**: 19630-19640.

Yu S, Li X, Liu G, Han J *et al.* Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* 2007; **145**: 539-555.

Yu W, Sun Y, Guo S, Lu B. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 3227-3240.

Yun J, Cao JH, Dodson MW, Clark IE *et al.* Loss-of-function analysis suggests that Omi/HtrA2 is not an essential component of the PINK1/PARKIN pathway in vivo. *J Neurosci* 2008; **28**: 14500-14510.

Zetser A, Gredinger E, Bengal E. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 5193-5200.

Zhang L, Karsten P, Hamm S, Pogson JH *et al.* TRAP1 rescues PINK1 loss-of-function phenotypes. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 2829-2841.

Zhang NY, Tang Z, Liu CW. alpha-Synuclein protofibrils inhibit 26 S proteasome-mediated protein degradation: understanding the cytotoxicity of protein protofibrils in neurodegenerative disease pathogenesis. *J Biol Chem* 2008; **283**: 20288-20298.

Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H *et al.* Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 13354-13359.

Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S *et al.* A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* 2002; **21**: 4411-4419.

Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ. Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 5018-5023.

Zschocke J. HSD10 disease: clinical consequences of mutations in the HSD17B10 gene. *J Inherit Metab Dis* 2012; **35**: 81-89.

Zschocke J, Rüter JP, Brand J, Lindner M *et al.* Progressive infantile neurodegeneration caused by 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency: a novel inborn error of branched-chain fatty acid and isoleucine metabolism. *Pediatr Res* 2000; **48**: 852-855.

Résumé

Perte de fonction de la voie « PINK1/Parkine » dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson : mécanismes et conséquences

La maladie de Parkinson (MP) est la seconde affection neurodégénérative en terme de fréquence. Son étiologie est inconnue et elle caractérisée par une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques de la substance noire. Dans la majorité des cas, la maladie est sporadique mais il existe des formes familiales monogéniques dues à des mutations de gènes spécifiques. L'ubiquitine-protéine ligase cytosolique Parkine (*PARK2*) et la sérine/thréonine kinase mitochondriale PINK1, dont les fonctions sont perdues dans les formes autosomiques récessives de MP, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la qualité mitochondriale, et en particulier dans la dégradation de mitochondries endommagées par un processus nommé mitophagie.

L'objectif de ce travail était d'élucider certains mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation de l'homéostasie mitochondriale par PINK1 et Parkine. Par différentes approches de biologie moléculaire, cellulaire, et d'imagerie, nous avons ainsi mis l'accent sur l'étude du rôle l'interaction de PINK1 et Parkine au niveau de la membrane mitochondriale externe, mais aussi dans le processus de biogenèse mitochondriale, ainsi que les conséquences de leur perte de fonction.

Dans la première partie du travail, nous avons découvert que PINK1 et Parkine s'associaient lors d'un stress mitochondrial au niveau du complexe d'import mitochondrial TOM, permettant l'import de la grande majorité des protéines adressées à la mitochondrie ; et que déstabiliser ce complexe suffisait à initier la mitophagie. Nous avons également montré que la Parkine, par sa fonction d'E3 ubiquitine-protéine ligase permettait, lorsqu'elle est activée par PINK1, de faciliter l'import de son substrat HSD17 β 10. La Parkine facilite également l'import d'un biosenseur moléculaire inductible permettant d'étudier la voie d'import classique des protéines a pré-séquence, développé au laboratoire.

La mitophagie n'est qu'un type de réponse mis en œuvre par la cellule lors d'un stress mitochondrial. Nous nous sommes alors intéressé, dans un modèle neuronal, au rôle de la Parkine dans ces différentes réponses, dont la biogenèse mitochondriale, l'UPR (*Unfolded Protein Response*) et la réponse antioxydante. En particulier, nous montrons qu'un stress mitochondrial induit une forte augmentation de l'expression de gènes clés de la biogenèse mitochondriale, uniquement en présence de Parkine. Nous avons aussi observé une *up*-régulation basale dans les neurones *PARK2*^{-/-}, reflétant possiblement une altération de la réponse aigüe au stress, liée à la dérégulation chronique de la voie de biogenèse mitochondriale.

Ensemble, ces résultats approfondissent notre connaissance des mécanismes moléculaires mis en jeu par la voie PINK1/Parkine dans le contrôle de la qualité mitochondriale, en mettant en évidence deux fonctions : l'import et la biogenèse mitochondriale. Ceci permet d'élargir notre compréhension de la physiopathologie des formes autosomiques récessives de MP, et possiblement de l'étendre aux formes sporadiques.

Mots clés : Parkine, PINK1, maladie de Parkinson, contrôle qualité mitochondriale, machinerie TOM, import mitochondrial, biogenèse mitochondriale

Abstract

Loss of function of the « PINK1/Parkin » signaling pathway in the pathophysiology of Parkinson's disease : mechanisms and consequences

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide. Etiology is unknown and a specific loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra is observed. In most cases, the disease is sporadic but familial monogenic forms due to mutations of specific genes exist. The cytosolic ubiquitin-protein ligase Parkin (*PARK2*) and the mitochondrial serine/threonine kinase PINK1, whose functions are lost in the autosomal recessive forms of PD, play an essential role in mitochondrial quality control, and particularly in the degradation of damaged mitochondria by a process called mitophagy.

The aim of this work was to elucidate some of the molecular mechanisms underlying the regulation of mitochondrial homeostasis by PINK1 and Parkin. Using different approaches of molecular biology, cell biology, and imaging, we have focused our study on the role of PINK1 and Parkin interaction at the outer mitochondrial membrane, in the mitochondrial biogenesis process and on the consequences of loss of function of the pathway.

In the first part of the work, we found that PINK1 and Parkin were associated during a mitochondrial stress in vicinity of the mitochondrial import TOM complex, implicated in the import of most proteins targeted to mitochondria; and that destabilizing this complex is sufficient to initiate mitophagy. We also showed that Parkin, when activated by PINK1 facilitates, through its function of E3 ubiquitin-protein ligase, the import of its substrate, HSD17 β 10. Parkin facilitates also the import of an inducible BRET-based molecular biosensor involving the classical pre-sequence import pathway, developed in the laboratory.

Mitophagy is only one type of response to a mitochondrial stress. We also focused, in a neuronal model, on the role of Parkin in different other responses, including mitochondrial biogenesis, unfolded protein response and the antioxidant response. In particular, we showed that mitochondrial stress induced a strong increase in the expression of mitochondrial biogenesis key genes, only in the presence of Parkin. We also observed a basal up-regulation of these genes *PARK2*^{-/-} neurones, possibly reflecting an alteration of acute stress response, associated with chronic deregulation of the mitochondrial biogenesis pathway.

Together, these results increase our understanding of the molecular mechanisms exerted by the PINK1/Parkin pathway in mitochondrial quality control, with a highlight on two functions: mitochondrial import and mitochondrial biogenesis. This expands our knowledge of the pathophysiology of autosomal recessive forms of PD, and possibly, sporadic ones.

Keywords : Parkin, PINK1, Parkinson's disease, mitochondrial quality control, TOM machinery, mitochondrial import, mitochondrial biogenesis.