



**HAL**  
open science

# Etude de la coopération de l'alpha-synucléine et de LRRK2 dans les dysfonctions mitochondriales dans la Maladie de Parkinson

Camille Gardier

► **To cite this version:**

Camille Gardier. Etude de la coopération de l'alpha-synucléine et de LRRK2 dans les dysfonctions mitochondriales dans la Maladie de Parkinson. Neurosciences. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS405 . tel-03418593

**HAL Id: tel-03418593**

**<https://theses.hal.science/tel-03418593>**

Submitted on 8 Nov 2021

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

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

# Etude de la coopération de l'alpha-synucléine et de LRRK2 dans les dysfonctions mitochondriales dans la Maladie de Parkinson

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée dans le  
Laboratoire des maladies neurodégénératives, UMR9199, MIRGen, CEA

École doctorale n°568  
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)  
Spécialité de doctorat: Science de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 7 novembre 2019, par

**Camille Gardier**

Composition du Jury :

<b>Michael Schumacher</b> Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay INSERM UMR 1195 (Faculté de médecine, Le Kremlin-Bicêtre)	Président
<b>Olga Corti</b> Directrice de Recherche, Sorbonne Universités INSERM U 1127, CNRS UMR 7225 (ICM, Paris)	Rapportrice
<b>Jean-Marc Taymans</b> Directeur de Recherche, Université Lille 2 INSERM UMR-S 1172 (Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille)	Rapporteur
<b>Anne Lombès</b> Directrice de Recherche, Université Paris-Descartes-Paris 5 INSERM U 1026, CRNS UMR 8104 (Hôpital Cochin, Paris)	Examinatrice
<b>Luc Bousset</b> Chargé de Recherche, Université Paris-Saclay CNRS UMR9199 (Institut François Jacob, Fontenay-aux-Roses)	Examineur
<b>Géraldine Liot</b> Maître de conférence, Université Paris-Saclay CNRS UMR 9199, (Institut François Jacob, Fontenay-aux-Roses)	Directrice de thèse
<b>Emmanuel Brouillet</b> Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay CNRS UMR 9199, (Institut François Jacob, Fontenay-aux-Roses)	Invité



## Remerciements

---

Je voulais commencer par remercier les membres de mon jury de participer à apposer le point final à cette aventure qu'aura été la thèse. Merci à Olga Corti et Luc Bousset d'avoir pris le temps de venir à MIRCCen tous les ans pour mes comités de suivi. Ces rendez-vous annuels m'ont aidée à prendre du recul sur mon projet, et vos conseils ont toujours été pertinents. Merci à Jean-Marc Taymans, d'avoir accepté d'être mon rapporteur et d'avoir pris le temps de répondre aux questions que j'ai pu avoir de temps en temps au cours de ma thèse. Merci à Anne Lombès d'être examinatrice dans mon jury de thèse et de nous avoir permis de venir utiliser le Seahorse à la fin de ma thèse. Merci à Michaël Schumacher d'avoir accepté de prendre la présidence de ce jury, alors que l'on vous sollicite tellement souvent pour les soutenances de thèse à MIRCCen. Plus généralement, merci à tous pour votre temps et d'apporter votre expertise scientifique à cette soutenance qui marque la fin de trois années de travail.

En ce qui concerne MIRCCen, je tiens tout d'abord à remercier Géraldine Liot, ma directrice de thèse. Quand je pense qu'au début je ne voulais pas faire d'*in vitro* ! Mais tu as su me transmettre ta passion, ta rigueur et je ne regrette rien. Grâce à toi j'ai appris bien plus que la culture cellulaire, la biochimie, et j'en passe. Tu as su trouver le parfait équilibre, pour être toujours présente tout en me laissant une grande autonomie, et c'est grâce à ça que j'ai autant grandi pendant ma thèse. On a réussi à trouver un excellent équilibre de travail, mais on a aussi construit une relation solide, et je pense sincèrement que je n'aurai pas pu trouver meilleure encadrante que toi. Alors vraiment, merci.

Je n'oublie pas que je ne serais jamais atterrie à MIRCCen si Emmanuel Brouillet ne m'avait pas prise en stage de M2. Merci de m'avoir laissé ma chance, d'avoir cru en moi. Les conversations avec toi ont toujours été scientifiquement enrichissantes, mais tu sais aussi toujours trouver les mots pour me faire rire, et ça c'est inestimable, surtout pendant la thèse. C'est aussi grâce à toi que j'ai eu la chance de travailler avec Noémie, qui a été mon mentor pendant mon stage de M2, mais aussi après. Noémie, tu as été un modèle de force et de persévérance pour moi. Tu as pris le temps de me former quand j'étais en M2, alors même que tu finissais ta thèse, tu m'as aidée à préparer mon oral pour le concours, tu m'as fait participer à l'écriture de la revue (qui m'a énormément aidée à m'approprier mon projet de recherche au début de ma thèse), tu m'as donné l'opportunité de participer à l'écriture de tes papiers... Tu as joué un rôle déterminant dans ma thèse, tu m'as vraiment beaucoup apporté, et je t'en suis très reconnaissante. Merci aussi à Marie-Claude, qui est un peu comme notre maman MIRCCen à tous. Tu as toujours su faire profiter tous les étudiants de passage à MIRCCen de ta gentillesse et de ta douceur, mais aussi et surtout de ton expertise en BM, et je n'ai pas fait exception. Merci aussi au reste de l'équipe Parkinson : Francesco, Pauline, Fanny (Lebourg) et Nadja pour les riches échanges que nous avons eus.

Sur le plan technique, je tiens à remercier Gaëlle Pennarun, Pascale Bertrand de nous avoir permis d'empreinter leur Amaxa, et Nathalie Gault pour nous avoir laissé utiliser le Seahorse. Merci aussi à Noëlle Dufour pour les (nombreuses) productions de lentivirus, mais aussi pour ta gentillesse, ta positive attitude et ta bonne humeur à toute épreuve ! C'est une chance de pouvoir travailler avec quelqu'un comme toi. Merci aussi à Fanny Lebourg de reprendre la suite des manips. Mais merci aussi de me faire rire à chaque fois qu'on se croise dans les couloirs, c'était vraiment cool surtout à la fin de la thèse. Merci à Cécile, Marie-Laure et Marie-Christine pour leur travail. Merci à Didier pour son talent informatique, sans toi les ordinateurs de MIRCCen ne tourneraient pas ! Et merci à Kristell, Laurent et Pascal qui font également tourner MIRCCen.

Au-delà des manips et des sciences, MIRCCen c'est surtout le monde des bisounours, dans lequel les étudiants sont enveloppés d'amour et de tendresse. Je ne mentirai pas, la thèse ça n'a pas été rigolo tous les jours. Mais grâce à vous, même la pire des journées à courir partout est supportable. J'ai appris énormément sur le plan professionnel, mais j'ai aussi construit des relations incroyablement riches et



fortes, et vous n' imaginez pas à quel point c'est dur de vous quitter. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté.

Merci aux thésards, ceux qui sont partis comme ceux qui sont toujours là : Anastasie, Audrey (Fayard et Vautheny), Brice, Charlotte (Duwat et Gary), Clémence (Dudeffant et Ligneul), Clément, Fanny, Francesco, Jean-Baptiste, Jérémy, Juliette, Kelly, Laurene, Lucie, Marianne, Marie, Marina, Mélissa, Noémie, Océane, Pauline, Pierre-Antoine, Séverine, Suzanne, Yaël et Yohann. Merci d'avoir égayé ces 3 années de thèse.

Merci aussi à tous les permanents de MIRCen, qui en sont les piliers : Alexis, Carole, Caroline, Charlène, Dimitri (même si tu es Servier tu comptes ;) ), Giles, Fanny, Gwen, Karine, Léopold, Maria, Marie-Claude, Mylène, Nadja, Nicolas, Noëlle et Pauline.

Un merci particulier à la bande de coureurs, qui ont significativement contribué à m'aider à gérer le stress de ma thèse, en étant toujours partants pour m'accompagner courir : Alexis, Agathe, Audrey, Clémence, Dimitri, Fanny, Laurene, Léopold (si on en croit la légende), Mélissa, Marianne, Mylène, Nadja et Nicolas. Je ne compte plus les courses thérapeutiques, les entraînements pour les semi... Merci pour votre motivation et votre soutien. Rdv en 2020 pour le prochain semi !

Au final, tous ensemble, on a partagé tellement de choses. La course à pied, les pots à l'Adada (et ailleurs), le ski, les weekends entre copains (le saut en parachute !!!) et j'en passe. Merci à tous pour votre amitié inestimable. J'espère que ça durera longtemps (mais vous savez que vous n'avez pas vraiment le choix).

Vous avez tous su faire de MIRCen un lieu de travail idéal, et de cette thèse un moment inoubliable. Bon courage pour la suite ! Ma porte vous sera toujours ouverte, n'oubliez pas que j'ai une chambre d'ami à Maidenhead.

Pour finir, il faut quand même que je remercie mes parents (et colocs), ma sœur préférée (parce qu'unique) et mon life partner Gaye, de m'avoir soutenue et surtout supportée pendant ces trois dernières années.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	1
<b>Liste des figures</b> .....	3
<b>Liste des tableaux</b> .....	5
<b>Introduction</b> .....	7
Chapitre I. La maladie de Parkinson .....	7
I. Epidémiologie, historique .....	7
II. Physiopathologie de la MP .....	8
A. Le système dopaminergique .....	8
A.1. La substance noire et le ST.....	8
A.2. Synthèse et métabolisme de la DA .....	10
A.3. Atteinte du système DA dans la MP.....	12
B. Anato-pathologie.....	13
B.1. Stades anatomiques de la pathologie .....	13
B.2. Symptomatologie, stades cliniques de la pathologie .....	15
B.3. Vulnérabilité de la substance noire dans la MP .....	17
B.3.a. Métabolisme de la DA et stress oxydant.....	17
B.3.b. Morphologie et activité des neurones DA .....	19
III. Traitements.....	19
A. Traitements médicamenteux pour troubles moteurs et non moteurs .....	19
A.1. Traitement des troubles moteurs .....	19
A.2. Traitement des troubles non moteurs .....	21
B. Traitements non médicamenteux .....	21
B.1.a. Stimulation cérébrale profonde .....	21
B.1.b. Thérapie génique.....	21
B.1.c. Greffe de cellules souches/iPS : thérapie restauratrice.....	22
B.1.d. Immunothérapie $\alpha$ syn.....	22
IV. Etiologie .....	23

A. 1- Formes génétiques .....	23
A.2. Formes autosomiques dominantes.....	24
A.3. Formes autosomiques récessives .....	26
B. 2- Formes sporadiques .....	27
V. Conclusion.....	30
Chapitre II. $\alpha$ syn .....	31
I. La protéine .....	31
A. Structure : domaines et leurs fonctions.....	31
B. Modifications post-traductionnelles (MPT) .....	32
C. Expression et localisation .....	34
II. Fonctions physiologiques.....	35
III. Pathologie liée à l' $\alpha$ syn .....	37
A. Les différentes formes d' $\alpha$ syn .....	38
B. Propagation.....	40
IV. Conclusion.....	44
Chapitre III. LRRK2 .....	45
I. La protéine .....	45
A. Structure: domaines et leurs fonctions.....	45
B. Phosphorylation/autophosphorylation .....	46
C. Expression et localisation .....	47
II. Fonctions physiologiques, substrats.....	49
A. LRRK2 et dynamique du cytosquelette .....	50
B. LRRK2 et trafic vésiculaire .....	50
C. LRRK2 et autophagie.....	51
D. LRRK2 et immunité .....	52
III. Pathologie .....	53
IV. Inhibiteurs de LRRK2.....	54
V. Conclusion.....	55

Chapitre IV. Interaction entre LRRK2 et l'αsyn.....	56
I. Données de la littérature qui montrent une interaction entre LRRK2 et l'αsyn.....	56
A. Données chez l'Homme.....	56
B. Effet de LRRK2 sur la toxicité de l'αsyn .....	57
C. Effet de LRRK2 sur l'agrégation de l'αsyn.....	60
D. Effets de LRRK2 sur la propagation de l'αsyn .....	61
II. Mécanismes possibles de l'interaction entre LRRK2 et l'αsyn - focus sur la mitochondrie .....	67
A. La neuroinflammation .....	67
B. L'autophagie .....	68
C. La mitochondrie.....	69
C.1. Métabolisme énergétique.....	71
C.2. Dynamique mitochondriale.....	73
Chapitre V. Revue - “The unlikely partnership between LRRK2 and α-synuclein in Parkinson's disease”, EJN, 2019 .....	77
<b>Hypothèses de travail et objectifs de l'étude.....</b>	<b>103</b>
Chapitre I. Prérequis .....	103
I. Article 1 : le domaine C-terminal de LRRK2 avec la mutation G2019S est suffisant pour induire la dégénérescence des neurones dopaminergiques <i>in vivo</i> (Cresto, Gaillard, Gardier et al. Sous presse - Annexe I) .....	103
II. Article 2 : la surexpression du fragment C-terminal de LRRK2 présentant la mutation G2019S dans la SNpc augmente la neurotoxicité de l'αsyn A53T <i>in vivo</i> (Cresto, Gardier et al. En préparation - Annexe II) .....	106
Chapitre II. Objectifs de la thèse.....	109
<b>Etude <i>in vitro</i> de l'interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l'αsyn – focus sur la mitochondrie .....</b>	<b>111</b>
Chapitre I. Choix du modèle .....	111
Chapitre II. Matériel et méthodes .....	112
Chapitre III. Résultats et Article 3 .....	117

I. Résultats.....	117
A. Expression de l'αsyn et de différentes formes de LRRK2 dans les neurones primaires .....	117
B. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et l'homéostasie mitochondriale .....	117
C. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et l'homéostasie mitochondriale après un stress mitochondrial aigu .....	119
D. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et l'homéostasie mitochondriale après un stress mitochondrial chronique .....	123
E. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et le taux d'ATP après un stress mitochondrial chronique, dans des cellules cultivées dans du BrainPhys™ .....	125
F. Comparaison de ΔLRRK2 et de LRRK2 .....	128
G. Effet de l'αsyn et de LRRK2 entière sur la viabilité cellulaire et le taux d'ATP après un stress mitochondrial aigu .....	130
II. Article 3 : Le mutant G2019S de LRRK2 augmente la phosphorylation de l'αsyn dans des neurones primaires, sans induire de toxicité mitochondriale marquée .....	131
A. Objectifs et synthèse de l'article .....	131
B. Article 3 .....	133
Chapitre IV. Discussion.....	161
I. Activité et effet de l'expression de RCKWD40 et SRCKWD40 (ΔLRRK2) <i>in vivo</i> .....	161
II. Absence de toxicité de ΔLRRK2 et de l'αsyn <i>in vitro</i> .....	162
III. Différences d'expression et d'activité entre ΔLRRK2 et LRRK2.....	164
A. Expression.....	164
B. Activité/phosphorylation.....	165
IV. Effets <i>in vitro</i> de l'expression de LRRK2 .....	166
A. LRRK2 et phosphorylation de l'αsyn.....	166
B. LRRK2 et mitochondrie .....	169
Chapitre V. Conclusion.....	172
Chapitre VI. Perspectives .....	173

I. La mitochondrie : aller plus loin .....	173
II. Autophagie.....	173
III. Expression de LRRK2 et protéines 14-3-3.....	174
IV. Astrocytes .....	174
V. $\Delta$ LRRK2 .....	175
VI. In vivo.....	175
<b>Contributions scientifiques.....</b>	<b>177</b>
I. Publications .....	177
II. Participations à des congrès – posters .....	177
<b>Bibliographie .....</b>	<b>179</b>
<b>Annexe I.....</b>	<b>218</b>
<b>Annexe II.....</b>	<b>251</b>



## Liste des abréviations

---

<b>αsyn</b>	alpha-synucléine
<b>AA</b>	Acide Aminé
<b>AADC</b>	<i>Aromatic L-amino Acid Decarboxylase</i>
<b>AAV</b>	Virus adéno-associé
<b>ADH</b>	Aldéhyde déshydrogénase
<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial
<b>ANT</b>	<i>Adenine Nucleotide Exchanger</i>
<b>AD</b>	Autosomal Dominant
<b>AR</b>	Autosomal Recessif
<b>ARK</b>	Ankyrine
<b>ARM</b>	Armadillo
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>ATP13A2</b>	ATPase de type P
<b>BH4</b>	Tetrahydropterine
<b>BHE</b>	Barrière Hémato-Encéphalique
<b>CI</b>	Complexe I
<b>CL</b>	Corps de Lewy
<b>CMA</b>	<i>Chaperone-Mediated Autophagy</i>
<b>COMT</b>	Catéchol-O-Méthyl Transférase
<b>COR</b>	<i>COOH terminal of Roc</i>
<b>CSPα</b>	<i>Cystein-String-Protein alpha</i>
<b>DA</b>	Dopamine
<b>DAT</b>	<i>Dopaminergic Transporter</i>
<b>DIV</b>	<i>Days In Vitro</i>
<b>DK</b>	<i>Dead Kinase (G2019S/D1994A)</i>
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DRP1</b>	<i>Dynamin-Related Protein 1</i>
<b>ERM</b>	Ezrine/Radixine/Moesine
<b>FADD</b>	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
<b>GPe</b>	Globus Pallidus externe
<b>GPI</b>	Globus Pallidus interne
<b>GWAS</b>	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>HVA</b>	Acide Homovanilique
<b>iPS</b>	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
<b>KD</b>	<i>Knock Down</i>
<b>KIN</b>	<i>Kinase</i>
<b>KO</b>	<i>Knock Out</i>
<b>LCR</b>	Liquide Céphalo-Rachidien
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihydroxyphenylalanine



LPS	Lipopolysaccharide
$\Delta$ LRRK2	Fragment C-terminal de LRRK2
LRRK2	<i>Leucine-Rich Repeat Kinase 2</i>
LV	Lentivirus
MAO-A/B	Monoamine Oxydase A/B
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
Mfn1/2	Mitofusine 1/2
MP	Maladie de Parkinson
MPP+	1-Méthyl-4-Phényl Pyridinium
MPT	Modification Post-Traductionnelle
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-TetrahydroPyridine
MSA	<i>Multiple System Atrophy</i>
MSN	<i>Medium Spiny Neurons</i>
NAC	<i>Non-Amyloid bêta Component</i>
NL	Neurites de Lewy
NM	Neuromélanine
NST	Noyau Sous-Thalamique
NT	Neurotransmetteur
OPA1	<i>Optic atrophy protein 1</i>
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PKA	Protéine Kinase A
PNH	Primate Non Humain
PP1 $\alpha$	Protéine Phosphatase 1 $\alpha$
PP2A	Protéine Phosphatase 2
ROC	<i>Ras-Of-Complex proteins</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor</i>
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
SNpc	Substance Noire <i>pars compacta</i>
SNpr	Substance Noire <i>pars reticulata</i>
SOD2	Superoxyde Dismutase 2
ST	Striatum
Tg	Transgénique
TH	Tyrosine Hydroxylase
TIM	Transporteur de la membrane mitochondriale interne
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TOM	Transporteur de la membrane mitochondriale externe
VMAT	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i>
VTA	<i>Ventral Tegmental Area</i>
WT	<i>Wild Type</i>

## Liste des figures

---

Figure 1. Représentation schématique des voies directe et indirecte en conditions physiologiques .....	10
Figure 2. Synthèse et métabolisme de la DA.....	11
Figure 3. La tyrosine hydroxylase (TH) et ses 3 principaux sites de phosphorylation. ....	12
Figure 4. Représentation schématique des voies directe et indirecte et leurs variations dans la MP .....	13
Figure 5. Marquage immunohistochimique de la TH dans des coupes transverses du cerveau moyen chez un patient atteint de la MP et un individu contrôle.....	14
Figure 6. Microscopie immunoélectronique montrant des CL et des NL, marqués par des anticorps anti- $\alpha$ syn .....	14
Figure 7. Stades de Braak.....	15
Figure 8. Evolution des symptômes moteurs et non moteurs associés à la MP .....	16
Figure 9. Arbre décisionnel pour l'initiation du traitement des troubles moteurs chez les patients .....	20
Figure 10. Mécanisme de la toxicité du MPTP. ....	28
Figure 11. Mécanismes de la toxicité de la roténone, du MPP+ et du paraquat .....	29
Figure 12. Schéma de l' $\alpha$ syn et de ses différents domaines .....	31
Figure 13. Alignement des séquences peptidiques de l' $\alpha$ syn humaine (seq_1) et de l' $\alpha$ syn de souris (seq_2). ....	32
Figure 14. Expression tissulaire de l'ARNm et de la protéine dérivés du gène SNCA chez l'homme. ....	34
Figure 15. Rôle de l' $\alpha$ syn à la synapse .....	37
Figure 16. Les différentes conformations de l' $\alpha$ syn .....	39
Figure 17. Résumé graphique des résultats obtenus dans l'étude de Kim et al., 2019. ....	42
Figure 18. Mécanismes possibles de propagation des espèces pathogènes d' $\alpha$ syn.....	44
Figure 19. Représentation schématique de LRRK2 et de ses différents domaines .....	45
Figure 20. Expression tissulaire de l'ARNm et de la protéine dérivés du gène LRRK2 chez l'homme .....	48
Figure 21. Voies de signalisations liées à LRRK2.....	49
Figure 22. Le métabolisme énergétique mitochondrial.....	72
Figure 23. Dynamique de la mitochondrie .....	73
Figure 24. Différents mécanismes possibles de l'interaction fonctionnelle entre l' $\alpha$ syn et LRRK2 dans la MP .....	76

Figure 25. Caractérisation biochimique des fragments C-ter de LRRK2 .....	104
Figure 26. Evaluation histologique de l'effet de $\Delta$ LRRK2 WT et G2019S dans la SNpc, 25 semaines post-injection.....	105
Figure 27. Evaluation histologique de l'effet de $\Delta$ LRRK2 G2019S et DK sur la toxicité de l' $\alpha$ syn A53T dans la SNpc, 6 semaines post-injection .....	107
Figure 28. Evaluation histologique de l'effet de $\Delta$ LRRK2 G2019S et DK sur la toxicité de l' $\alpha$ syn A53T dans la SNpc, 15 semaines post-injection.....	108
Figure 29. Design expérimental des traitements chroniques, pour les cellules cultivées dans du N+B27 ou dans du BrainPhys™ .....	113
Figure 30. Expression de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 dans les neurones primaires.....	118
Figure 31. Effet de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale .....	119
Figure 32. Mise au point du traitement aigu à la roténone .....	120
Figure 33. Effet de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale, après un traitement aigu à la roténone .....	122
Figure 34. Mise au point du traitement chronique à la roténone .....	123
Figure 35. Effet de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale, avec ou sans traitement chronique à la roténone.....	124
Figure 36. Expression de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 dans les neurones primaires cultivés avec du BrainPhys™ .....	125
Figure 37. Mise au point du traitement chronique à la roténone pour des cellules cultivées avec du BrainPhys™ .....	126
Figure 38. Effet de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale, avec ou sans traitement chronique à la roténone, dans des cellules cultivées avec du BrainPhys™ .....	127
Figure 39. Comparaison de $\Delta$ LRRK2 et LRRK2 dans des cellules HEK .....	129
Figure 40. Effet de la co-expression de l' $\alpha$ syn A53T et LRRK2 sur la sensibilité aiguë à des doses croissantes de roténone.....	130

## Liste des tableaux

---

Tableau 1. Principaux gènes impliqués dans la MP.....	24
Tableau 2. Etudes <i>in vivo</i> de l'interaction entre l'αsyn et LRRK2 et leurs principaux résultats....	62
Tableau 3. Etudes <i>in vitro</i> de l'interaction entre l'αsyn et LRRK2 et leurs principaux résultats...	65
Tableau 4. Liste des anticorps utilisés en western blot (WB) et en immunofluorescence (IF) ..	114



### Chapitre I. La maladie de Parkinson

#### I. Epidémiologie, historique

La maladie de Parkinson (MP) est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche près de 5 millions de personnes dans le Monde, mais ce chiffre pourrait doubler d'ici 2030 (Dorsey et al. 2007). Sa prévalence est estimée à 1% des personnes de plus de 65 ans et augmente avec l'âge, ce dernier étant considéré comme le principal facteur de risque de la MP. Elle est environ 1,5 fois plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. En France, en 2015, la prévalence était de 2,50 pour 1000 habitants, et l'incidence annuelle de 0,39 nouveaux cas pour 1000 personnes (Carcaillon-Bentata et al. 2018).

Les symptômes moteurs de cette pathologie ont été décrits pour la première fois en 1817 par James Parkinson. Dans son "*Essay on the Shaking Palsy*", il rapportait les cas de 6 patients présentant des tremblements de repos, une bradykinésie et parfois une akinésie ce qui l'ont mené à nommer la pathologie "paralysie agitante" (Kempster, Hurwitz, et Lees 2007).

La première personne à faire référence à cette *paralysis agitans* comme la MP fut William Rutherford Sanders en 1865 (Sanders 1865), puis cette désignation fut rendue célèbre en 1872 par le neurologue Jean-Martin Charcot (Charcot 1872).

En 1895, Brissaud suggéra que la substance noire *pars compacta* (SNpc) pourrait être la zone atteinte dans la MP (Brissaud 1895) après avoir observé des tremblements de repos ressemblant à un syndrome parkinsonien chez un patient avec une tumeur dans le pédoncule cérébral droit qui affectait la SNpc ipsilatérale (Blocq et Marinescu 1893).

En 1919, Trétiakoff fut le premier à observer une forte perte de neuromélanine dans la SNpc des patients parkinsoniens - due à l'absence des neurones contenant ce pigment - ainsi que la présence d'inclusions cytoplasmiques appelées Corps de Lewy (CL) (Trétiakoff 1919). Il les nomma ainsi car des éléments similaires avaient précédemment été décrits dans d'autres régions cérébrales de patients parkinsoniens par Fritz Jakob Heinrich Lewy, en 1912 (Lewy 1912). Il en conclut que les tremblements et la rigidité des patients parkinsoniens étaient causés par une dégénérescence de la SNpc.

En 1958, Carlsson identifia la présence de dopamine (DA) dans le cerveau et suggéra que la MP pourrait lui être liée (Carlsson 1959). Le déficit en DA dans le striatum (ST) et la SNpc de cerveaux de

patients parkinsoniens fut réellement décrit en 1960 par Ehringer et Hornykiewicz (Ehringer et Hornykiewicz 1960). Cette découverte mena au développement de stratégies thérapeutiques visant à augmenter la transmission dopaminergique via le précurseur de la DA, la L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa).

Le premier lien entre MP, environnement et mitochondrie a été fait en 1983, lorsque Langston et collaborateurs ont décrit le développement d'un syndrome parkinsonien aigu chez un groupe de toxicomanes exposés au MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), une toxine mitochondriale qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. Leur syndrome était indiscernable de la MP (Langston et al., 1983). Par la suite, une diminution marquée de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale fut décrite dans les cerveaux de patients parkinsoniens (Schapira 1993). Les premières formes héréditaires de la MP ont été identifiées à la fin des années 90, avec la découverte des mutations dans le gène *SNCA* codant pour la protéine  $\alpha$ -synucléine ( $\alpha$ syn) (Polymeropoulos et al. 1997). Ensuite l' $\alpha$ syn fut identifiée comme étant l'un des principaux composants des CL (Spillantini et al. 1997). En 2004, chez certaines familles, des mutations dans le gène codant pour la protéine Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) furent identifiées (Paisán-Ruiz et al. 2004; Zimprich et al. 2004). Puis en 2005, 3 groupes ont découvert la mutation G2019S dans le domaine kinase de cette protéine dont on sait aujourd'hui qu'il s'agit du variant pathogène le plus fréquent des formes de la MP associées à LRRK2 (Di Fonzo et al. 2005; Hernandez et al. 2005; Kachergus et al. 2005).

La MP est donc connue depuis des années pour ses troubles moteurs, la perte caractéristique des neurones DA de la SNpc et la formation d'inclusions cytoplasmiques (CL). Nous présenterons dans la suite du manuscrit plusieurs notions permettant de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie neurodégénérative.

## **II. Physiopathologie de la MP**

### **A. Le système dopaminergique**

#### **A.1. La substance noire et le ST**

La SNpc, structure principalement impliquée dans les symptômes moteurs de la MP, fait partie des ganglions de la base ou noyaux gris centraux. Cet ensemble de structures sous corticales comprend également le striatum (ST) (noyau caudé et putamen), le noyau sous-thalamique (NST) et le globus pallidus interne (GPI) et externe (GPe). Ces structures sont essentielles dans la programmation et l'exécution des mouvements.

Les ganglions de la base forment avec le cortex et le thalamus des boucles thalamo-corticales. Parmi elles, on distingue la voie directe (Figure 1, voie représentée en rouge) qui permet d'initier les mouvements volontaires et la voie indirecte (Figure 1, voie représentée en bleu) qui inhibe les mouvements volontaires concurrents. L'équilibre et la coordination entre ces deux voies est important pour la sélection et l'exécution des actions de mouvements appropriées.

Le ST est une structure clé des ganglions de la base. Il est composé principalement de neurones GABAergiques, les neurones épineux de taille moyenne (MSN, pour *Medium Spiny Neurons*). Les MSNs qui projettent vers le globus pallidus externe (GPe) forment la voie indirecte et ceux qui projettent vers le globus pallidus interne (GPi) et la substance noire *pars reticulata* (SNpr) forment la voie directe. Le reste des neurones du ST sont des interneurons inhibiteurs et quelques neurones cholinergiques (Grillner et Robertson 2015).

Le ST reçoit des afférences glutamatergiques excitatrices des structures corticales et thalamiques, mais aussi des afférences dopaminergiques de la SNpc. Ces projections glutamatergiques et dopaminergiques convergent vers les épines dendritiques des MSNs.

Dans la voie directe, l'activation corticale entraîne la libération de glutamate qui active les MSNs du putamen. Ces neurones expriment la substance P, la dynorphine et les récepteurs dopaminergiques D1. Ils projettent vers la SNpr et le GPi. Les MSN sont des cellules GABAergiques, et vont donc exercer une action inhibitrice sur les neurones du GPi et de la SNpr, qui sont également GABAergiques. Cette inhibition de la SNpr empêche donc qu'elle inhibe les neurones thalamiques glutamatergiques, qui reçoivent des afférences de la SNpr et projettent eux-mêmes vers le cortex. La levée de l'inhibition sur le thalamus entraîne donc l'activation des mouvements.

Dans la voie indirecte, l'activation du cortex va également entraîner l'activation des MSNs striato-pallidiens. Ils expriment l'énképhaline et les récepteurs dopaminergiques D2, et ils projettent indirectement vers la SNpr via le GPe et le NST. Ces MSNs GABAergiques vont inhiber les neurones, eux aussi GABAergiques, du GPe, ce qui permet la levée de l'inhibition des neurones glutamatergiques du NST. L'activation de ces neurones glutamatergiques va permettre l'activation des neurones GABAergiques inhibiteurs de la SNpr projetant vers le thalamus. Cette voie indirecte entraîne une diminution de l'activité locomotrice (Calabresi et al. 2014).

Il existerait des différences d'excitabilité entre les MSNs striataux D1 et D2, les neurones D2 ayant une plus haute fréquence de potentiels d'action, ainsi qu'une plus forte affinité pour la DA. De plus, les MSNs de la voie indirecte sont plus petits et plus excitables que les MSN de la voie directe (Eidelberg et Surmeier 2011). La voie de signalisation des récepteurs D1 augmente l'excitabilité des neurones en réponse à une libération prolongée de glutamate, mais réduit la réponse en cas de libération transitoire. La stimulation des récepteurs D2 diminue l'excitabilité des neurones striato-pallidiens et leur réponse à une stimulation glutamatergique (Surmeier et al. 2007). La DA, via ces récepteurs D1 et D2, semble donc



jouer un rôle dans l'activation des voies directes et indirectes. La coordination entre ces deux voies est primordiale pour une exécution correcte des mouvements et il a été montré qu'elles étaient co-activées pendant l'initiation du mouvement (Cui et al. 2013).

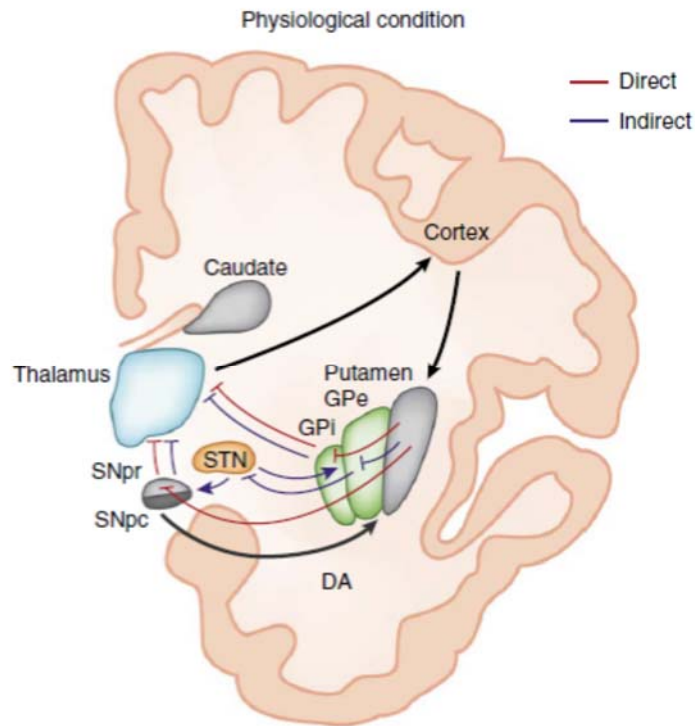


Figure 1. Représentation schématique des voies directe (en rouge) et indirecte (en bleu) en conditions physiologiques (Calabresi et al. 2014).

## A.2. Synthèse et métabolisme de la DA

La DA est une catécholamine, qui est une famille de composés synthétisés à partir de la tyrosine jouant un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques des systèmes nerveux central et périphérique. On retrouve des neurones dopaminergiques dans 3 structures du mésencéphale : la SN (groupe A9), l'aire tegmentale ventrale (VTA, *Ventral Tegmental Area*) (groupe A10) et l'aire rétro-rubrale (groupe A8). Comme il a été dit précédemment, les neurones DA de la SNpc projettent vers le striatum dorsal via la voie nigro-striée et font partie du circuit des ganglions de la base pour réguler le contrôle des mouvements volontaires (Figure 1) (Luo et Huang 2016).

La DA est un neurotransmetteur (NT) très enrichi dans la région nigro-striée (Carlsson 1959). Elle est synthétisée à partir de tyrosine transformée par la tyrosine hydroxylase (TH) en L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA). Cette dernière est elle-même transformée en DA grâce à la décarboxylase des L-acide aminés aromatiques (AADC, pour *aromatic L-amino acid decarboxylase*). La TH catalyse l'étape

initiale et limitante de la synthèse des catécholamines, et c'est une mono-oxygénase contenant du fer, qui a besoin de tetrahydropterine (BH4) comme co-facteur (Figure 2) (Nagatsu et al. 2018).

Après sa libération dans les fentes synaptiques, la DA peut être recaptée par les neurones via le transporteur de la DA (DAT, pour *Dopamine Transporter*) puis être métabolisée par la Mono Amine Oxydase A (MAO-A). Elle peut aussi être recaptée par les cellules gliales et y être métabolisée par la MAO-A et la MAO-B (Youdim, Edmondson, et Tipton 2006). La catéchol-O-méthyl transférase (COMT) peut aussi intervenir dans sa dégradation. L'action de la COMT et des MAO sur la DA conduit à la formation d'acide homovanilique (HVA). Environ 90% de la DA synaptique peut être recaptée par les neurones, soit pour être dégradée, soit pour être recyclée et stockée dans des vésicules, pour être réutilisée.

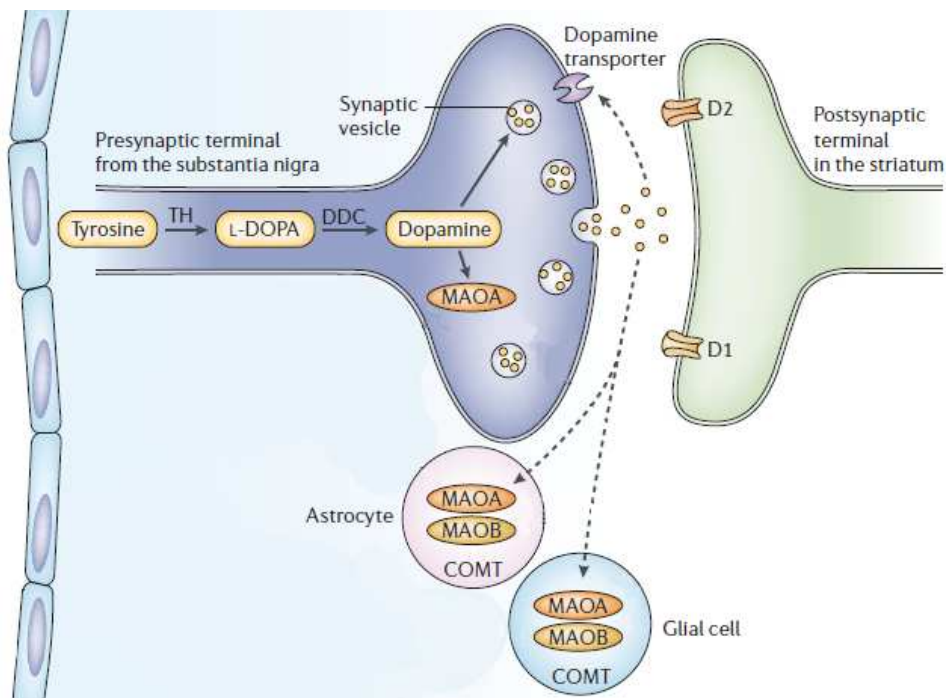


Figure 2. Synthèse et métabolisme de la DA. Adapté de Youdim et al., 2006.

Un excès de DA cytosolique peut induire un stress oxydant, l'activité de la TH (qui est l'enzyme limitante de la synthèse de la DA) est donc très finement régulée (Tabrez et al. 2012). Un mécanisme important de cette régulation est la phosphorylation de la TH au niveau de 3 de ses résidus localisés dans son domaine de régulation, les sérines 19, 31 et 40 (Daubner, Le, et Wang 2011). Son activité est positivement régulée par la phosphorylation de ces résidus par diverses kinases dont la principale est la PKA, qui la phosphoryle au niveau de sa S40. Cette phosphorylation diminue l'affinité de la TH pour les catécholamines. Comme ces dernières exercent un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la TH, la phosphorylation de la S40 augmente l'activité de la TH (Lou et al. 2010).

De plus, la phosphorylation de la S19 a également un effet de régulateur positif de l'activité de la TH. En effet, CAMKII, en la phosphorylant sur la S19, accélère la phosphorylation de la S40 par cette même kinase et permet également le recrutement des protéines 14-3-3 à la TH, ce qui potentialise la phosphorylation de la S40 (Figure 3) (Lou et al. 2010).

En ce qui concerne la régulation négative de l'activité de la TH, la protéine phosphatase 2 (PP2A) est un acteur essentiel. Cette phosphatase, en déphosphorylant les sérines de la TH, permet une diminution de son activité (Peng et al. 2005).

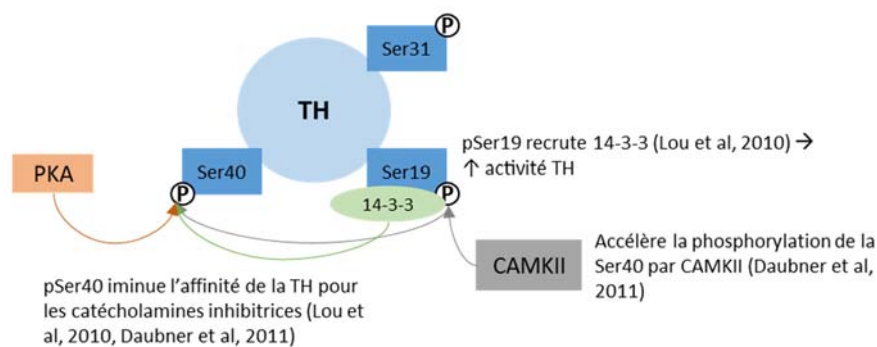


Figure 3. La tyrosine hydroxylase (TH) et ses 3 principaux sites de phosphorylation.

### A.3. Atteinte du système DA dans la MP

Dans les ganglions de la base, la DA renforce la voie directe (activatrice) et inhibe la voie indirecte (inhibitrice). Dans la MP, la perte de ce contrôle dopaminergique mène à un déséquilibre en faveur d'une hyperactivation de la voie indirecte, qui entraîne une inhibition pathologique globale du cortex moteur (Figure 4) (Charvin et al. 2018). Cependant cette hyperactivation ne suffit pas à expliquer la physiopathologie des symptômes moteurs de la MP. En effet, le renforcement de la voie indirecte renforce l'inhibition exercée par les neurones du putamen du GPe. Cela va lever l'inhibition exercée par les neurones du GPe sur le NST. On aura donc une hyperactivation du NST, qui va à son tour activer les neurones du GPi. Cependant, une augmentation de la cadence des potentiels d'action dans le NST et le GPi n'est pas systématiquement associée à un syndrome parkinsonien dans les modèles animaux de la MP, et au contraire il a été montré qu'une augmentation de l'excitabilité des neurones de la GPi induite par la stimulation du NST chez le primate non humain (PNH) pouvait être associée à une amélioration motrice (Quiroga-Varela et al. 2013). La MP serait donc liée à des modifications beaucoup plus complexes du traitement des informations, comme une synchronisation neuronale anormale et un couplage cortico-subcortical à des fréquences spécifiques (Poewe et al. 2017). Une des principales modifications est la variation de l'activité oscillatoire des ganglions de la base dans les modèles animaux et chez les patients atteints de la MP (Obeso et al. 2017). Il a été montré chez des patients non traités

une prédominance d'oscillations d'ordre bêta (10-25 Hz) dans le NST, le GPi et le cortex qui peuvent être supprimées par un traitement dopaminergique. En revanche, il y a une augmentation des oscillations d'ordre gamma (60-80 Hz) dans les hyperkinésies comme celles induites par la lévodopa (Poewe et al. 2017).

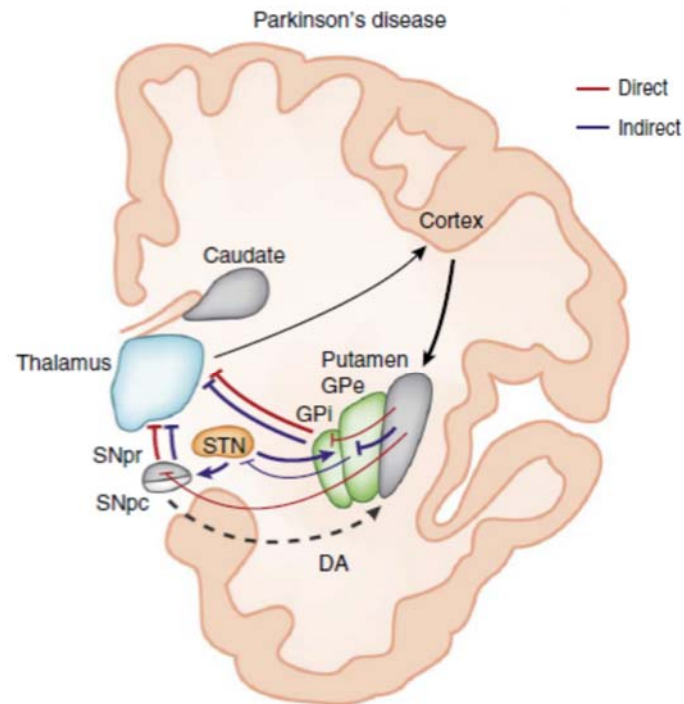


Figure 4. Représentation schématique des voies directe (en rouge) et indirecte (en bleu) et leurs variations dans la MP (Calabresi et al. 2014).

## B. Anatomo-pathologie

### B.1. Stades anatomiques de la pathologie

La MP est caractérisée par la dégénérescence des neurones DA de la SNpc, et la diminution de la libération de DA dans le ST qui en résulte entraîne les symptômes moteurs observés dans la MP (Figure 5). Mais en réalité la pathologie commence à se développer bien avant l'apparition de ces dysfonctionnements moteurs. Dans la SNpc, on estime que la perte neuronale est déjà de 60-70% au moment de leur apparition (Lang et Lozano 1998).

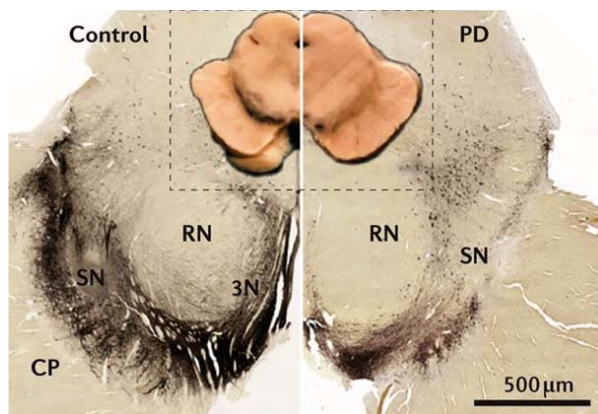


Figure 5. Marquage immunohistochimique de la TH dans des coupes transverses du cerveau moyen chez un patient atteint de la MP (à droite) et un individu contrôlé (à gauche). 3N = 3ème fibres nerveuses, CP = pédoncule cérébral, RN = noyau rouge. (Poewe et al. 2017)

La neurodégénérescence n'est pas limitée à la SN. Une perte cellulaire existe aussi dans le locus coeruleus, le noyau dorsal du nerf vague, le noyau du raphé, le noyau basal de Meynert, et d'autres structures catécholaminergiques du tronc cérébral (Lees, Hardy, et Revesz 2009). Cette perte cellulaire est accompagnée de la formation d'inclusions intraneuronales : les corps de Lewy (CL) et les neurites de Lewy (NL) (Braak et al. 1999), des dépôts intracellulaires fibrillaires de protéines et de lipides (Figure 6). Ils contiennent notamment des membranes, des organites et des vésicules fragmentés, mais aussi la protéine pré-synaptique  $\alpha$ syn phosphorylée et ubiquitylée (De Wit, Baekelandt, et Lobbestael 2018; Shahmoradian et al. 2019; Spillantini et al. 1997, 1998). On les retrouve dans de nombreuses régions, dont la SN, le locus coeruleus, le noyau basal, les noyaux du nerf crânien moteur et les divisions centrales et périphériques du système nerveux autonome.

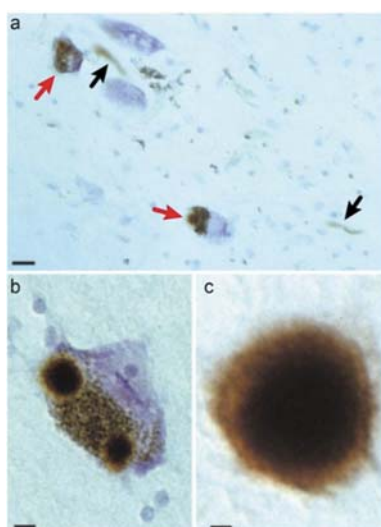


Figure 6. Microscopie immunoélectronique montrant des CL (flèches rouges) et des NL (flèches noires), marqués par des anticorps anti- $\alpha$ syn. Echelle 20 $\mu$ m (Spillantini et Goedert 2018).

En observant la distribution des CL et NL, Braak et collaborateurs ont suggéré que le développement de la maladie commencerait dans le bulbe olfactif ou dans le noyau moteur dorsal du nerf vague, deux régions cérébrales dont les axones s'étirent jusqu'à la surface du corps, et qui constituent ainsi un lien direct avec l'environnement extérieur (stades 1 et 2). A ces stades, les patients sont quasiment asymptomatiques mais ils présentent une anosmie dans environ 90% des cas, sûrement liée à l'atteinte du bulbe olfactif. Les CL sont ensuite retrouvés dans la substance noire, l'amygdale, le NST et le prosencéphale basal aux stades 3 et 4. Enfin, ils se propagent jusqu'au néocortex (stades 5 et 6) (Figure 7) (Braak et al. 2003). Il est cependant important de noter que les CL ne sont pas spécifiques de la MP, car on peut également en retrouver dans les cerveaux d'individus qui ne présentent pas de symptômes de cette maladie (Berg et al. 2014; Surmeier, Obeso, et Halliday 2017).

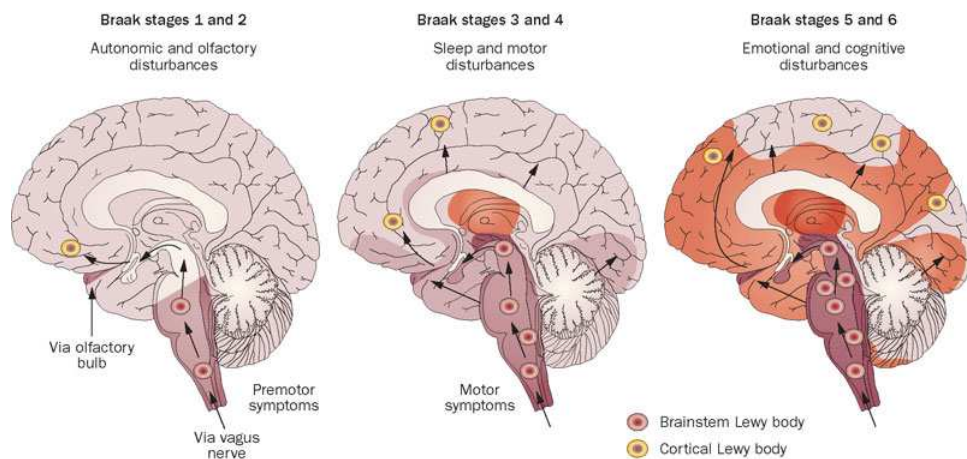


Figure 7. Stades de Braak (Doty 2012).

## B.2. Symptomatologie, stades cliniques de la pathologie

L'évolution de la MP est lente et progressive avec un début insidieux. C'est une maladie extrêmement hétérogène, qui débute en général vers 60 ans mais peut être plus précoce, et commencer avant les 40 ans du patient. La MP est caractérisée par un ensemble de symptômes, à la fois moteurs et non moteurs (Poewe et al. 2017). Les premiers symptômes sont non moteurs tels que les troubles du sommeil, la dépression, l'anosmie, l'incontinence urinaire et la constipation. Ils peuvent passer inaperçus ou être mal interprétés pendant une période de plusieurs années que l'on nomme la phase prodromale et qui précède l'apparition des symptômes moteurs (Lees et al. 2009).

Le tableau clinique moteur associé à différents degrés une triade de symptômes : une akinésie (difficulté à initier les mouvements) /bradykinésie (lenteur de l'exécution des mouvements), une rigidité



dite plastique (hypertonie) et un tremblement de repos (source : [https://www.vidal.fr/recommandations/1533/parkinson\\_maladie\\_de/la\\_maladie/](https://www.vidal.fr/recommandations/1533/parkinson_maladie_de/la_maladie/)).

Ces troubles de la coordination motrice ont de nombreuses conséquences, qui apparaissent en général aux stades avancés de la maladie : des modifications d'élocution, des troubles de l'écriture, des difficultés pour avaler, ainsi que des troubles de l'équilibre (Figure 8).

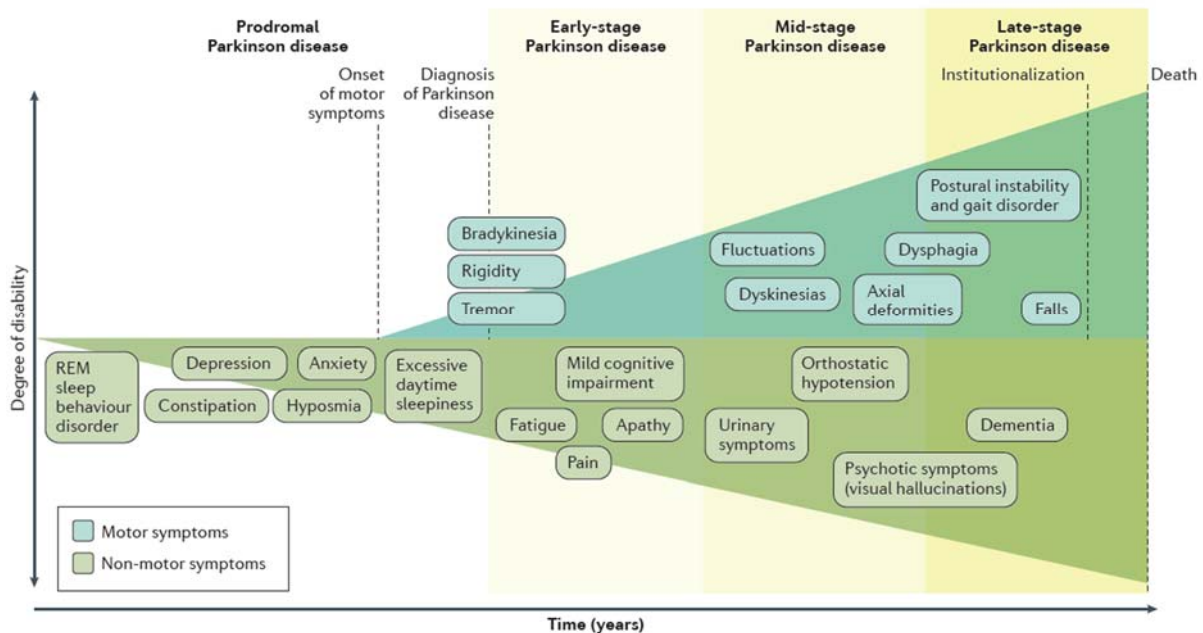


Figure 8. Evolution des symptômes moteurs (en bleu) et non moteurs (en vert) associés à la MP (Poewe et al. 2017).

On distingue plusieurs stades de la MP, suivant l'évolution de sa sévérité (source : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/parkinson-maladie>) :

- Stade I : premiers signes unilatéraux, ne gênant pas la vie quotidienne.
- Stade II : signes encore unilatéraux, mais entraînant une gêne.
- Stade III : signes bilatéraux, posture modifiée, pas de handicap grave, autonomie complète.
- Stade IV : handicap plus sévère, marche encore possible, autonomie limitée.
- Stade V : marche impossible (fauteuil roulant, alitement), perte d'autonomie.

Le diagnostic clinique repose essentiellement sur la recherche des symptômes moteurs caractéristiques. Il est confirmé par une nette amélioration des symptômes, >30%, grâce à un traitement dopaminergique. Cependant le diagnostic est difficile, en particulier pendant la phase prodromale, au cours de laquelle la symptomatologie est aspécifique et la réponse au traitement dopaminergique pas toujours marquée (source : [https://www.vidal.fr/recommandations/1533/parkinson\\_maladie\\_de/la\\_maladie/](https://www.vidal.fr/recommandations/1533/parkinson_maladie_de/la_maladie/)).

### **B.3. Vulnérabilité de la substance noire dans la MP**

La SN n'est pas la seule structure contenant des neurones DA dans le système nerveux. Alors pourquoi est-ce que ce sont spécifiquement ces neurones qui dégénèrent dans la MP ? Cette question majeure reste pour l'instant sans réponse définitive, mais il y a cependant plusieurs hypothèses bien étayées qui apportent des éléments de réponse.

Comme il a été mentionné précédemment, l'âge est le principal facteur de risque de la MP. Dans les neurones de la SNpc, le taux de délétions de l'ADN mitochondrial (ADNmt) augmente avec l'âge, ce qui cause un dysfonctionnement de la mitochondrie via une déficience de la chaîne respiratoire (Wong et Krainc 2017). Le stress oxydant augmente aussi avec l'âge, ce qui augmente la nitration de l' $\alpha$ syn et son agrégation (Wong et Krainc 2017). Cependant ces facteurs ne suffisent pas à expliquer la dégénérescence préférentielle des neurones de cette structure.

#### **B.3.a. Métabolisme de la DA et stress oxydant**

Tout au long de leur vie, les neurones dopaminergiques sont particulièrement exposés à des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour *Reactive Oxygen Species*) et de l'azote, provenant du métabolisme de la DA cytosolique. En effet, lorsqu'elle excède les concentrations physiologiques, la DA cytosolique (non vésiculaire) subit une oxydation par la MAO-A et l'aldéhyde déshydrogénase (ADH), et cela génère la production de quinones et d'espèces réactives de l'oxygène (Tabrez et al. 2012). Il a été rapporté que la SN de patients parkinsoniens contenait des protéines, des lipides et des acides nucléiques modifiés par oxydation, ce qui serait cohérent avec l'existence d'un stress oxydant (Mor et al. 2017). Le principal mécanisme de défense cellulaire contre ces dérivés du métabolisme est la recapture de la DA libérée dans les synapses par le transporteur de la DA, ainsi que sa séquestration dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2, pour *Vesicular Monoamine Transporter*). Ce procédé permet le stockage de la DA mais permet également de détoxifier l'environnement extracellulaire (Perez et al. 2002). Dans les vésicules où la DA est stockée, le pH est plus bas que dans le cytosol, ce qui permet de la stabiliser (Segura-Aguilar et al. 2014).

Un lien a également été établi entre l' $\alpha$ syn et la DA. En effet, l' $\alpha$ syn pourrait être modifiée par la DA oxydée, qui inhiberait la formation des fibrilles en stabilisant les intermédiaires oligomériques de l' $\alpha$ syn (Conway 2001; Norris et al. 2005). De plus, une interaction fonctionnelle a été montrée entre l' $\alpha$ syn et la TH (Perez et al. 2002) et cette interaction pourrait diminuer l'activité de la TH (Lou et al. 2010; Peng et al. 2005; Perez et al. 2002). Une augmentation du taux d' $\alpha$ syn pourrait donc être associée à une dysfonction des neurones dopaminergiques via une dérégulation de la TH. Il a en effet été montré dans des cerveaux de personnes saines que le nombre de neurones exprimant l' $\alpha$ syn dans la SN



augmentait avec l'âge, mais également que les neurones exprimant l' $\alpha$ syn présentaient une diminution de l'expression de la TH (Chu et Kordower 2007). On aurait donc un effet de l' $\alpha$ syn spécifiquement sur les neurones DA.

Le stress oxydant généré par la DA pourrait donc être un facteur de susceptibilité dans la MP. Cependant, certains neurones DA du mésencéphale sont plus prompts à la dégénérescence que d'autres. Les neurones DA du tiers ventral de la SN sont plus vulnérables que les neurones de son tiers dorsal, et les neurones DA de la VTA sont les plus résistants (Collier, Kanaan, et Kordower 2011). Chez le PNH, il a été montré que le nombre de neurones DA (identifiés par l'expression de la TH) diminuait naturellement au cours du vieillissement dans ces 3 régions, la perte la plus importante étant observée dans le tiers ventral de la SN, puis dans le tiers dorsal, et un peu moins dans la VTA. Ces animaux présentaient également une forte augmentation du nombre de neurones exprimant l' $\alpha$ syn ainsi que de l'intensité de ce marquage (Collier et al. 2011). Il doit donc y avoir des éléments particuliers aux neurones DA de la SN qui entraîne leur dégénérescence préférentielle dans la MP. Dans des embryons de souris *knock out* (KO) pour l' $\alpha$ syn, il a été montré qu'il y avait moins de neurones TH+ dans la SN à E13,5 que chez les embryons de souris WT, sans qu'il y ait de différence dans les neurones dopaminergiques de la VTA, ce qui suggère également une différence entre les neurones de ces deux régions (Tarasova et al. 2018).

En plus de la DA et de ses métabolites, la SN est particulièrement riche en fer, qui est un cofacteur essentiel des enzymes impliquées dans la biosynthèse des catécholamines. Le cycle d'oxydo-réduction du fer peut engendrer des ROS (Dickson 2007). Dans les neurones DA de la SN, l'oxydation de la DA, sa conjugaison avec d'autres molécules et une polymérisation entraînent la formation de neuromélanine (NM), un pigment sombre proche de la mélanine qui se lie aux peptides et aux lipides. La formation de NM est liée à l'excès de DA dans le cytosol, non prise en charge par les vésicules synaptiques. La NM semble être le principal site de stockage du fer sous une forme inactive qui empêche la formation de ROS par la réaction de Fenton (Segura-Aguilar et al. 2014). La NM pourrait donc jouer un rôle protecteur par la séquestration de métaux. Cependant, en cas de surcharge en fer, la NM pourrait devenir toxique pour les neurones, par exemple en liant le fer sous sa forme réactive, ce qui favoriserait des réactions redox nocives. Il a effectivement été montré une augmentation du fer "redox-actif" associée à la NM dans la SN de patients atteints de la MP (Faucheux et al. 2003). Des expériences *in vivo* ont montré que l'injection de NM dans la SN de rats induisait une activation microgliale et la dégénérescence des neurones DA (Segura-Aguilar et al. 2014), confirmant son potentiel délétère.

C'est la dégénérescence de ces neurones contenant de la NM qui est caractéristique de la MP, la présence de ce pigment pourrait donc être un facteur de susceptibilité de la SN. Il est intéressant de noter que la NM n'est pas retrouvée chez les rongeurs.

### **B.3.b. Morphologie et activité des neurones DA**

Les neurones DA de la SNpc pourraient également être particulièrement vulnérables dans la MP à cause de leur morphologie. En effet, ces neurones de projection ont de longs axones fins, peu ou pas myélinisés. Il a été proposé que la myélinisation diminuerait la demande énergétique en facilitant la transmission des influx nerveux (Tagliaferro et Burke 2016). De plus, ces neurones ont un nombre très important de terminaisons axonales au niveau du ST. Il a été estimé que dans la SNpc du cerveau de rat, les terminaisons axonales d'un seul neurone DA couvraient plus 5% du volume total du striatum et donnaient naissance jusqu'à 245000 synapses (Matsuda et al. 2009). Un neurone du GPe n'aurait qu'environ 2000 synapses et un neurone GABA du striatum qu'environ 5000 (Tagliaferro et Burke 2016). Les neurones DA de la VTA ont également des arborescences axonales plus petites et établissent moins de synapses que les neurones DA de la SNpc. Il est possible qu'une structure axonale si dense entraîne des dépenses énergétiques très élevées, qui pourraient rendre les neurones de la SNpc particulièrement fragiles. Les neurones DA ont également une activité spontanée et se comportent comme des pacemakers autonomes. Cette activité est caractérisée par de larges oscillations des concentrations de calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire avec un faible tamponnage du  $Ca^{2+}$  et requiert une homéostasie calcique finement régulée (Ghiglieri, Calabrese, et Calabresi 2018).

Il semble donc que les neurones DA de la SN présentent un certain nombre de caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui pourraient participer à expliquer leur dégénérescence préférentielle dans la MP.

## **III. Traitements**

La MP étant caractérisée à la fois par des troubles moteurs et non moteurs, la prise en charge des patients vise à soulager ces symptômes par différentes méthodes. Malheureusement, on ne dispose pas à ce jour de traitement curatif de cette pathologie.

### **A. Traitements médicamenteux pour troubles moteurs et non moteurs**

#### **A.1. Traitement des troubles moteurs**

Les traitements médicamenteux des symptômes moteurs visent à rétablir le niveau normal de DA dans le cerveau. La lévodopa, précurseur de la DA, est le traitement de référence. Elle permet un apport exogène de DA pour soulager les symptômes moteurs de la maladie. On l'associe à un inhibiteur de la

dopa-décarboxylase périphérique (bensérazide, carbidopa), afin de limiter sa métabolisation en DA au niveau périphérique, qui entraînerait une perte d'efficacité. On peut également l'associer à un inhibiteur de la COMT (entacapone) ou un inhibiteur de la MAO-B (rasagiline) pour diminuer son catabolisme. Une autre possibilité, seuls ou en association à la lévodopa, est l'utilisation d'agonistes de la DA, qui agissent directement sur les récepteurs post-synaptiques de la voie nigro-striée pour remplacer l'effet de la DA.

L'ensemble de ces traitements n'entrave pas la dégénérescence neuronale, et les doses doivent donc être adaptées au fur et à mesure de l'évolution de la maladie. A long terme, ces traitements mènent à des effets indésirables invalidants comme les dyskinésies (mouvements anormaux et involontaires) de fin de dose causées par la lévodopa. En France, les recommandations concernant la mise en place de ce type de traitement sont basées sur la sévérité des symptômes et l'âge du patient (Figure 9).

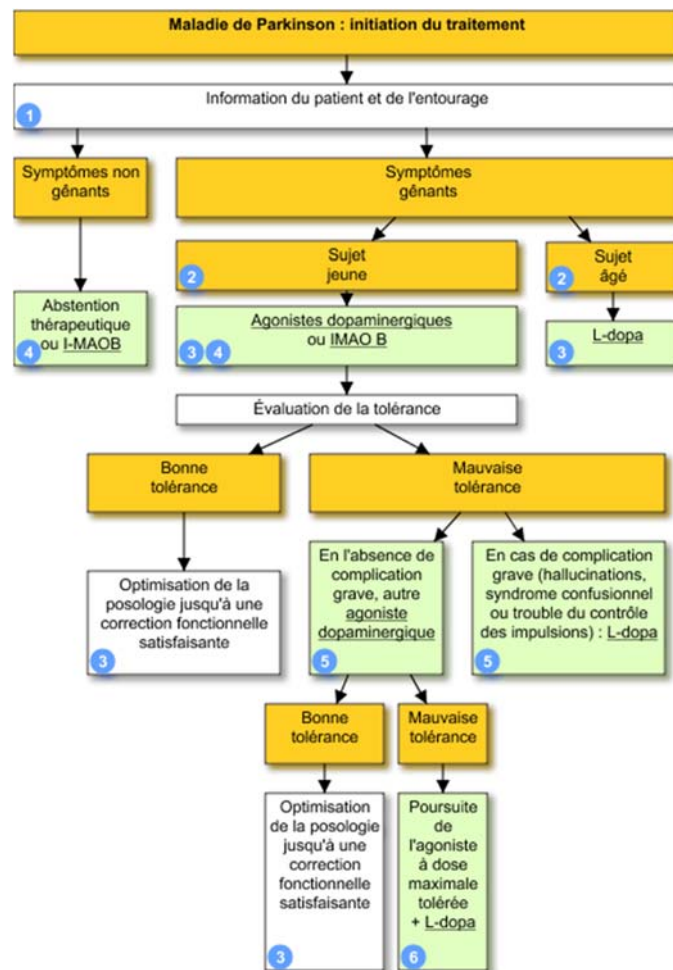


Figure 9. Arbre décisionnel pour l'initiation du traitement des troubles moteurs chez les patients.  
Source : Vidal Recos.

## **A.2. Traitement des troubles non moteurs**

En plus des symptômes moteurs, il est important de prendre en charge les troubles non moteurs associés à la MP par un traitement adapté. Par exemple, la dépression est très fréquente chez les patients et nécessite une prise en charge psychologique qui peut être associée à un traitement antidépresseur en fonction des patients. Une grande partie des patients souffre également de constipation (due à une dysmotilité colique), qui peut être améliorée par l'emploi de laxatifs. Globalement, il est important de bien identifier ces symptômes et de les gérer de manière adaptée (Haute Autorité de Santé 2016).

## **B. Traitements non médicamenteux**

### **B.1.a. Stimulation cérébrale profonde**

C'est une technique chirurgicale qui consiste à implanter des électrodes dans le NST, qui envoient des impulsions électriques activant les cellules nerveuses. Elle réduit fortement les symptômes moteurs de la maladie ainsi que les dyskinésies et les fluctuations motrices. Cependant les critères pour en bénéficier sont très stricts et elle ne peut être proposée qu'à 10-15% des patients. En effet, elle ne fonctionne que chez les patients dont les symptômes moteurs ne sont pas soulagés par la L-DOPA et sur les tremblements résistants aux médicaments de patients qui répondent autrement bien à la L-DOPA (Poewe et al. 2017).

### **B.1.b. Thérapie génique**

L'objectif de ces thérapies est de modifier génétiquement les cellules du cerveau afin de pallier au manque de DA dû à la dégénérescence de la voie nigro-striée. Notamment, un vecteur lentiviral a été mis au point afin d'augmenter la synthèse de DA dans les ganglions de la base : ProSavin. Il y a 3 enzymes limitantes dans la biosynthèse de la DA, exprimées dans les neurones de la SN : la TH et la cyclohydrolase 1, qui facilitent la conversion de la tyrosine en lévodopa, et l'AADC qui convertit la lévodopa en DA (Daubner et al. 2011). ProSavin est un lentivirus tricistronique qui permet l'expression de ces 3 enzymes dans les cellules non dopaminergiques, lorsqu'il est injecté dans les parties non motrices du ST (putamen) (Palfi et al. 2014). Chez le rat et le PNH, ce vecteur est bien toléré et permet une forte amélioration des symptômes parkinsoniens avec la restauration d'environ 50% des concentrations striatales normales en DA dans le modèle macaque MPTP (Jarraya et al. 2009). Des études cliniques de phase I/II sont actuellement en cours (Charvin et al. 2018; Palfi et al. 2014).

Une autre thérapie génique actuellement en essai clinique est un AAV permettant d'exprimer l'AADC dans le putamen des patients afin de compenser la perte en DOPA décarboxylase induite par la neurodégénérescence nigro-striée, et ainsi augmenter la conversion de la lévodopa en DA (Charvin et al. 2018:201).

Ces approches virales permettraient un traitement en une seule injection mais la nécessité du recours à la chirurgie risque de limiter leur indication aux patients présentant des stades avancés de la MP.

### **B.1.c. Greffe de cellules souches/iPS : thérapie restauratrice**

Une autre stratégie envisagée afin de pallier la dégénérescence de la voie nigro-striée est le remplacement des cellules DA perdues par la greffe de cellules fœtales mésencéphaliques dans le striatum. Bien que les cellules greffées soient fonctionnelles et produisent de la DA, les essais cliniques réalisés à ce jour n'ont globalement pas montré de bénéfices significatifs chez les patients (Kordower et al. 2008; Li et al. 2008). De plus, il est difficile d'obtenir des tissus fœtaux, et leur utilisation pose des questions éthiques, ce qui limite ce type d'approche. En revanche l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPS, pour *induced pluripotent stem cells*), qui peuvent être différenciées en neurones DA, est prometteuse. La greffe de cellules pose cependant des problèmes d'immunocompatibilité. Le meilleur moyen de diminuer les réactions immunitaires serait d'effectuer des autogreffes. Cependant l'obtention d'iPS autologues pour chaque patient est longue et très coûteuse. Pour contourner ce problème, le CiRa (*Center for iPS Cell Research and Application*, Université de Kyoto, Japon) est en train de constituer une banque de cellules issues de personnes homozygotes pour leur type HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Ces stocks d'iPS de « super donneurs » permettraient de faire correspondre le type HLA du greffon avec celui du patient receveur. Il a été estimé qu'il faudrait une banque d'iPS issue de plus de 1000 « super donneurs » pour avoir une compatibilité avec la totalité de la population mondiale (Présentation de S. Yamanaka, World Parkinson Congress 2019, Kyoto). Plusieurs études cliniques utilisant des iPS sont actuellement en cours (Barker et al. 2017). Si cette approche permettrait de compenser la perte des neurones DA, elle ne traiterait pas les causes de la maladie et ne permettrait probablement qu'un soulagement temporaire des patients.

### **B.1.d. Immunothérapie $\alpha$ syn**

Une autre approche en étude actuellement consiste à cibler l' $\alpha$ syn afin d'interférer avec sa toxicité dans la MP, en bloquant sa propagation, en inhibant son agrégation ou en augmentant son élimination par une immunothérapie. On distingue l'immunothérapie active (stimuler le système

immunitaire par injection d'αsyn recombinante pour qu'il produise lui-même des AC dirigés contre l'αsyn) et l'immunothérapie passive (apporter directement à l'organisme des AC dirigés contre l'αsyn). Dans les deux cas, le mécanisme d'action supposé est que l'anticorps dirige l'αsyn vers la microglie ou les astrocytes activés qui peuvent la phagocytter et la dégrader (Brundin, Atkin, et Lamberts 2015). PRX002 est un AC monoclonal humanisé dirigé contre la partie C-terminale de l'αsyn, et ayant une plus forte affinité pour les formes agrégées par rapport aux formes monomériques. Il est actuellement en essai clinique de phase II. En ce qui concerne l'immunothérapie active, deux vaccins anti-αsyn sont actuellement en cours de développement (Charvin et al. 2018). Les premières études cliniques ont montré que ces traitements n'entraînent pas d'effets indésirables majeurs chez le volontaire sain et induisent bien la présence d'anticorps anti-αsyn dans le sang.

Cependant, malgré les divers traitements abordés ci-dessus, aucune thérapie curative n'existe à l'heure actuelle. Pour pallier à ce problème, il serait nécessaire de pouvoir diagnostiquer précocement les patients et de pouvoir suivre l'évolution de la maladie au cours du temps. Le développement de biomarqueurs robustes est donc essentiel pour suivre l'évolution de la MP. Il faudrait également pouvoir stratifier les patients atteints de la MP afin d'obtenir des résultats d'essais cliniques plus probants et ensuite adapter les traitements aux sous-populations de patients qui répondent à certains critères.

#### **IV. Etiologie**

Les causes exactes de la MP restent méconnues. La plupart des cas sont sporadiques, c'est-à-dire se développant de manière spontanée, sans raison connue (95%). L'âge est cependant considéré comme étant le facteur de risque le plus important (Del Rey et al. 2018). Depuis l'identification en 1997 d'une mutation dans le gène *SNCA* codant pour l'αsyn, on distingue les formes génétiques des formes sporadiques de la MP (Polymeropoulos et al. 1997).

##### **A. 1- Formes génétiques**

A ce jour, plusieurs gènes ont été associés à la MP, avec une certaine hétérogénéité dans les phénotypes, l'âge de début et le mode de transmission. Parmi eux, certains ont une transmission autosomique dominante (*SNCA*, *LRRK2*, et *VPS35*) et d'autres récessive (notamment *PRKN*, *PINK1*, *DJ-1* et *ATP13A2*) (Tableau 1) (Corti, Lesage, et Brice 2011).

**Tableau 1. Principaux gènes impliqués dans la MP.** AD = Autosomique Dominant, AR = Autosomique Récessif. Adapté de (Poewe et al. 2017).

Gène	Locus	Chromosome	Protéine	Mode de transmission	Apparition de la maladie
SNCA	PARK1	4q22.1	αsyn	AD	Tardif/Précoce
LRRK2	PARK8	12q12	LRRK2	AD	Tardif
VPS35	PARK17	16q11.2	VPS35	AD	Précoce
PRKN	PARK2	6q26	Parkine	AR	Juvenile/Précoce
PINK	PARK6	1p36.12	PINK1	AR	Juvenile/Précoce
DJ1	PARK7	1p36.23	DJ-1	AR	Juvenile/Précoce
ATP13A2	PARK9	1p36.13	ATP13A2	AR	Juvenile

## **A.2. Formes autosomiques dominantes**

En 1997, Polymeropoulos et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence l'existence de mutations pathogènes impliquées dans la MP (Polymeropoulos et al. 1997). En effet, ils ont identifié une ségrégation familiale indiscutable d'une mutation faux sens dans le gène *SNCA* codant pour l'αsyn, avec un phénotype autosomique-dominant. Cette mutation entraîne le remplacement de l'alanine en position 53 par une thréonine (Polymeropoulos et al. 1997). Les patients avec cette mutation présentent des phénotypes variés, allant de formes classiques tardives de la MP à des formes atypiques plus précoces et plus graves, avec une forte prévalence de démences, de problèmes psychiatriques et de dysfonctions autonomes (Corti et al. 2011).

D'autres mutations faux sens de *SNCA* ont été identifiées par la suite, dont A30P, E46K, H50Q et G51N (Krüger et al. 1998; Lesage et al. 2013; Proukakis, Houlden, et Schapira 2013; Zarranz et al. 2004). Les patients avec la mutation A30P ont un phénotype proche des formes sporadiques de la MP, en revanche les patients E46K ont une pathologie plus sévère de début précoce et une démence à CL diffus (Corti et al. 2011). Leur pénétrance est de 100% (Dawson, Ko, et Dawson 2010).

Il a également été montré que des duplications ou des triplications du locus *SNCA* pouvaient entraîner la MP avec une corrélation inverse entre le nombre de répétitions et l'âge de début de la maladie, et une corrélation positive avec la sévérité, ce qui suppose qu'une augmentation de la quantité d'αsyn peut accélérer la pathogenèse de la MP (Chartier-Harlin et al. 2004; Ibáñez et al. 2004; Singleton, Farrer, et Bonifati 2013).

En 2002, le lien a été fait entre une famille japonaise présentant une MP autosomique dominante et une région du chromosome 12p11.2-q13.1, qui a été nommée *PARK8*, puis *LRRK2* (Funayama et al. 2002). Deux groupes ont ensuite identifié simultanément plusieurs mutations faux sens de ce gène chez des familles avec une transmission autosomique dominante de la MP (Paisán-Ruíz et al. 2004; Zimprich et al. 2004). Au sein de ces familles, le début de la maladie était plutôt tardif (> 50 ans), bien que cela soit variable (Kachergus et al. 2005). A ce jour, 6 mutations faux sens de *LRRK2* sont considérées comme étant pathogènes et codent pour les substitutions suivantes : R1441G/C/H, Y1699C, G2019S, et I2020T (Kluss, Mamais, et Cookson 2019). Toutes sont localisées dans des régions importantes sur le plan fonctionnel.

Globalement, les mutations de *LRRK2* sont retrouvées chez environ 10% des patients avec des formes autosomiques dominantes de la MP, 3,8% des patients avec des formes sporadiques et 1,8% des contrôles sains, ce qui fait d'elles la cause génétique la plus fréquente de la MP (Corti et al. 2011). Les mutations de *LRRK2* entraînent des MP dont le début est à un âge similaire aux formes sporadiques (55-65 ans). Les symptômes moteurs des patients *LRRK2* incluent des tremblements de repos, une rigidité, une akinésie, une instabilité posturale et une difficulté à marcher, ce qui rappelle les symptômes des formes sporadiques de la MP. Les patients *LRRK2* répondent également positivement au traitement par la lévodopa. De plus, en imagerie TEP, on retrouve chez les patients *LRRK2* symptomatiques des altérations du système dopaminergique qui sont typiques des formes sporadiques. En effet, ils présentent une réduction de l'accumulation de 18F-dopa dans les projections striatales des neurones dopaminergiques, une diminution de la liaison du 11C-tétrabénazine à VMAT et une réduction de la liaison du 11C-méthylphénidate au DAT (revu en détail dans Biskup and West, 2009). Globalement, les patients présentant des mutations de *LRRK2* sont indiscernables sur le plan clinique de ceux atteints de formes sporadiques de la MP.

La mutation la plus fréquente de *LRRK2* est la mutation G2019S, située dans le domaine kinase, qui a été identifiée en parallèle par trois groupes (Di Fonzo et al. 2005; Hernandez et al. 2005; Kachergus et al. 2005). De manière surprenante, cette mutation n'est pas seulement retrouvée dans les formes génétiques mais aussi dans certaines formes sporadiques de la MP. En effet, elle est retrouvée chez 4% des patients avec des formes héréditaires de la MP mais aussi chez 1% des patients sporadiques (Gilks et al. 2005; Healy et al. 2008; Lesage et al. 2007). Sa fréquence est cependant très variable entre les populations. En effet, elle est très rare en Asie, en Afrique du Sud et en Europe du Nord, alors qu'elle est plus fréquente chez les Juifs Ashkénazes (10-30% des cas de MP) et chez les Arabes d'Afrique du Nord (30-40% des cas de MP) (Corti et al. 2011). La pathologie causée par cette mutation est tardive et difficilement discernable des formes idiopathiques de la MP (Healy et al. 2008; Marras et al. 2016; Pont-Sunyer et al. 2017). La plupart des patients présentent des corps de Lewy (Giasson et al. 2006; Gilks et al. 2005) mais pas tous (Gaig et al. 2007; Giasson et al. 2006). Sa pénétrance est incomplète et fortement



liée à l'âge, passant de 28% à l'âge de 59 ans à 51% à l'âge de 69 ans, puis 74% à 79 ans (Healy et al. 2008).

Un autre gène impliqué dans les formes autosomiques dominantes de la MP est *VPS35*, qui code pour une protéine qui régule l'endocytose et le renouvellement des vésicules synaptiques à travers la voie de l'endocytose médiée par les Rab. La seule mutation connue de cette protéine est D620N, qui entraîne une MP de début précoce (< 50 ans), mais sinon similaire aux formes idiopathiques (Lunati, Lesage, et Brice 2018).

### **A.3. Formes autosomiques récessives**

Les formes autosomiques récessives de la MP ont été liées à des formes de la MP à début précoce, et des mutations dans divers gènes ont été identifiées, notamment *PRKN* (Kitada et al. 1998), *DJ-1* (Bonifati et al. 2003), *PINK1* (Valente 2004) et *ATP13A2* (Ramirez et al. 2006).

*PINK1* (*PTEN-induced putative kinase 1*) est une sérine/thréonine kinase mitochondriale. En conditions physiologiques, elle est liée à la membrane mitochondriale externe puis est internalisée via les translocases de la membrane mitochondriale externe (TOM, pour *translocase of the outer membrane*) et interne (TIM) de manière dépendante du potentiel de membrane (Helley et al. 2017). Au cours de son import, *PINK1* subit une série de clivages protéolytiques. La forme clivée est libérée dans le cytosol où elle est dégradée par le protéasome. Ce procédé maintient un niveau bas de *PINK1* en conditions physiologiques (Durcan et Fon 2015). En cas de dommage des mitochondries et de chute du potentiel de membrane, l'import mitochondrial de *PINK1* est bloqué et elle s'accumule au niveau de la membrane mitochondriale externe. Cette accumulation initie le contrôle qualité mitochondrial par une cascade d'activation qui permet le recrutement de la Parkine à la mitochondrie (Durcan et Fon 2015). La Parkine est une E3 ubiquitine ligase qui, une fois activée, permet l'ubiquitinylation et l'élimination progressive de plusieurs protéines mitochondriales par le processus de mitophagie. Parmi les cibles principales de la Parkine on retrouve notamment la Mitofusine 1 (*Mfn1*) et la Mitofusine 2 (*Mfn2*), qui sont deux GTPases essentielles au processus de fusion mitochondriale (Tanaka et al. 2010). Les mitochondries sont alors de plus en plus fragmentées, ce qui permet d'isoler les mitochondries endommagées de celles qui restent saines et de les éliminer. Dans la MP, les mutations de la Parkine entraînent sa perte de fonction, et donc une dérégulation du contrôle qualité mitochondrial, qui mène à une dégénérescence marquée des neurones de la substance noire mais aussi du locus coeruleus, et sont la cause la plus fréquente de MP à début précoce (Corti et al. 2011).

Les mutations de DJ-1 sont la cause la plus fréquente de formes autosomiques récessives de la MP (Corti et al. 2011). C'est une protéine impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, dont la lutte contre le stress oxydant. Les formes pathogènes de DJ-1 se relocalisent à la membrane mitochondriale externe lors d'un stress oxydant, rendant de ce fait les cellules plus sensibles à ce dernier (Kaur, Mehan, et Singh 2019). La pénétrance des mutations de *DJ-1* semble être complète chez les individus qui en cumulent deux différentes (Dawson et al. 2010).

Le gène *ATP13A2* code une protéine de la superfamille des ATPases de type P, avec dix domaines transmembranaires, localisée aux lysosomes (Ramirez et al. 2006). Ses mutations génèrent des formes tronquées retenues dans le réticulum endoplasmique et dégradée par le protéasome, et donc un dysfonctionnement des lysosomes (Ramirez et al. 2006). Les patients présentant des mutations de ce gène développent une pathologie très précoce (<20 ans) (Lunati et al. 2018).

Les mutations récessives de ces différents gènes entraînent une pathologie précoce avec un phénotype clinique proche des formes sporadiques, mais une neuropathologie distincte. La pathologie liée à la Parkinson est caractérisée par une dégénérescence de la SNpc et du locus coeruleus, pas toujours associée à des CL (Schneider et Alcalay 2017), alors que les mutations de PINK1 entraînent une dégénérescence nigrale avec la formation de CL et de NL (Samaranch et al. 2010). Enfin, la pathologie due aux mutations de DJ-1 comprend une dégénérescence sévère de la SNpc et du locus coeruleus ainsi que des CL présents de manière diffuse (Taipa et al. 2016). En ce qui concerne ATP13A2, aucune donnée à ce sujet n'a été rapportée (Lunati et al. 2018).

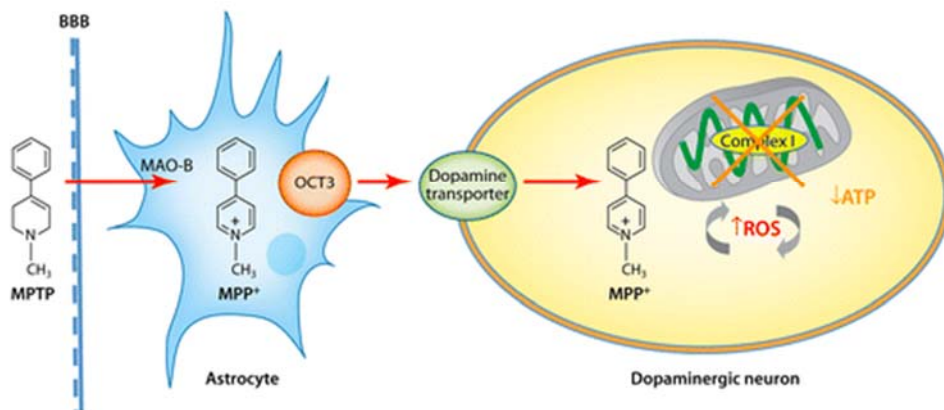
En plus de ces mutations impliquées dans la MP, des études de GWAS ont identifié des variants génétiques fréquents dans des gènes comme LRRK2, SNCA, MAPT (microtubule-associated protein tau) ou GBA (glucosylceramidase beta) qui contribuent à augmenter le risque de développer la MP (Lill 2016). Les variants des loci de MAPT (Caffrey et Wade-Martins 2007) et SNCA (Brockmann et al. 2013; Cardo et al. 2012) ont montré la plus forte association avec le risque de développer la MP.

## **B. 2- Formes sporadiques**

Comme il a été mentionné précédemment, la plupart des cas de MP sont dits sporadiques, et la pénétrance des gènes impliqués dans les formes héréditaires est rarement complète. Cela laisse donc supposer qu'il existerait d'autres facteurs de risque de développer la MP. Outre l'âge, il est maintenant acquis que des facteurs environnementaux peuvent correspondre à un facteur de risque de la MP. L'hypothèse de Braak suggère que les voies olfactives et digestives pourraient être le lieu de

développement de la MP. Ce sont deux régions anatomiques qui ont la particularité d'interagir directement avec l'environnement et d'être reliées au système nerveux. Elles pourraient donc être la porte d'entrée des toxines environnementales et permettre leur atteinte du système nerveux (Chen et Ritz 2018).

L'hypothèse environnementale de la MP a été fortement influencée par la découverte de la toxicité du MPTP au début des années 1980 (Langston et al., 1983; Singer and Ramsay, 1990). Le MPTP est formé pendant la synthèse d'un analogue de la mépéridine. Il traverse la barrière hémato-encéphalique et est métabolisé dans les cellules gliales par la MAO-B en 1-méthyl-4-phényl pyridinium (MPP+) (Obeso et al. 2017). Le MPP+ est une neurotoxine puissante qui entre dans les neurones dopaminergiques par le DAT. Il inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale de ces cellules, ce qui entraîne une déplétion en Adénosine TriPhosphate (ATP), un stress oxydant et la mort des neurones par apoptose (Corti et al. 2011) (Figure 10). Chez les patients exposés, cela entraîne des lésions sélectives des neurones dopaminergiques, et un syndrome parkinsonien qui est amélioré par le traitement à la L-DOPA. Comme le MPTP a une structure similaire à certains pesticides, la découverte de sa toxicité a mené à une étude plus approfondie du lien entre l'environnement et la MP. Par la suite, de nombreux facteurs environnementaux ont été associés à la MP, certains augmentant le risque de la développer (exposition à certains pesticides, solvants, métaux, et les traumatismes crâniens) et d'autres semblant plutôt le diminuer (par exemple, la consommation de caféine, d'ibuprofène, l'exercice physique ou le fait d'être fumeur) (Obeso et al. 2017).



**Figure 10. Mécanisme de la toxicité du MPTP.** BBB = Blood Brain Barrier (Barrière Hémato-Encéphalique), OCT3 = organic cation transporter (transporteur des cations organiques) (Goldman 2014).

Parmi les pesticides qui ont été liés à la MP, le paraquat et la roténone sont ceux pour lesquels les données épidémiologiques ont été le plus fortement appuyées par des données expérimentales, et ils sont utilisés pour générer des modèles animaux de la MP.

La roténone est également une toxine mitochondriale, qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. Elle a longtemps été utilisée comme insecticide. Etant très lipophile, elle traverse facilement la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) et les membranes cellulaires. Chez l'animal, l'exposition à la roténone récapitule les principales caractéristiques de la MP. Sa toxicité mitochondriale entraîne une diminution de la production d'ATP, une augmentation des ROS, active la microglie et altère le bon fonctionnement du protéasome (Betarbet et al. 2006) (Figure 11). La roténone entraîne une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques et l'accumulation d'inclusions cytoplasmiques d' $\alpha$ syn. Le syndrome parkinsonien qui en découle comprend une bradykinésie, une rigidité et des tremblements de repos (Goldman 2014). Des études épidémiologiques ont montré que les agriculteurs utilisant la roténone ou les personnes vivant à proximité de sites où elle était utilisée présentaient une augmentation d'un facteur  $\sim 1,5-3$  du risque de développer la MP (Tanner et al. 2011).

Le paraquat est un analogue structural du MPTP. C'est l'un des pesticides les plus largement utilisés dans le monde, mais son usage est interdit dans l'Union Européenne. Il peut traverser la BHE et entrer dans les neurones dopaminergiques par les DAT après avoir été converti en paraquat+ (Figure 11). Chez l'animal, l'exposition au paraquat entraîne un syndrome parkinsonien qui présente de nombreuses similarités avec la MP. Il augmente la peroxydation des lipides, diminue les défenses antioxydantes de la cellule, altère la fonction mitochondriale et augmente l'expression et l'agrégation de l' $\alpha$ syn. Tout cela entraîne une dégénérescence sélective des neurones DA. La relative sélectivité de sa toxicité pour les neurones DA est probablement due en partie à leur plus forte sensibilité au stress oxydant (voir partie sur vulnérabilité des neurones DA) (Goldman 2014).

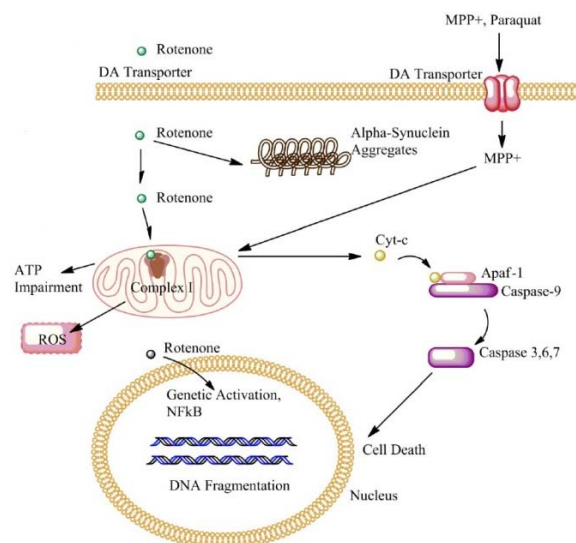


Figure 11. Mécanismes de la toxicité de la roténone, du MPP+ et du paraquat (Cabezas et al. 2013).

Il est fort probable qu'il existe un lien entre les facteurs génétiques et environnementaux, et cette hypothèse est soutenue par plusieurs études. Par exemple, il a été montré que des souris surexprimant LRRK2 G2019S étaient plus sensibles à la toxicité du MPTP (Karuppagounder et al. 2015). De même, des neurones primaires de souris KO pour la Parkine sont plus sensibles à la toxicité de la roténone que des neurones de souris sauvages (WT) (Casarejos et al. 2006). Les souris KO pour l' $\alpha$ syn sont protégées contre la toxicité du MPTP, et au contraire les souris transgéniques surexprimant l' $\alpha$ syn humaine y sont plus sensibles (Dauer et al. 2002; Klivenyi et al. 2006; Song et al. 2004).

## **V. Conclusion**

La MP est donc caractérisée sur le plan histologique par la perte sélective des neurones DA pigmentés de la SNpc, ainsi que la formation de CL et de NL, contenant notamment de l' $\alpha$ syn. Ses mécanismes sont encore mal connus, mais il est probable qu'elle soit rarement liée à une mutation génétique unique, ou à l'exposition à un facteur environnemental précis. La plupart des cas de la MP résulteraient plutôt d'une étiologie multifactorielle, résultant de l'action d'une combinaison de facteurs protecteurs et nocifs, et de l'interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux. L'étude des mécanismes de la toxicité de l' $\alpha$ syn, et comment ils sont impactés par d'autres facteurs (comme LRRK2) est donc essentielle. Nous allons maintenant nous intéresser plus en détails à l' $\alpha$ syn et LRRK2, les deux protéines autour desquelles nous avons construit notre travail.

## Chapitre II. $\alpha$ syn

L' $\alpha$ syn fait partie de la famille des synucléines, avec la bêta et la gamma synucléine, mais seule l' $\alpha$ syn est retrouvée dans les CL et les NL (Spillantini et Goedert 2018). Au-delà de la MP, l' $\alpha$ syn est plus largement impliquée dans les synucléinopathies, dont la démence à CL et l'atrophie multisystématisée (MSA, pour *multiple system atrophy*). Les démences à CL ressemblent à la MP en termes de dépôts d' $\alpha$ syn, mais dans la MSA l' $\alpha$ syn forme des inclusions cytoplasmiques dans les cellules gliales (en général les oligodendrocytes) plutôt que dans les neurones (Bendor, Logan, et Edwards 2013). Le fait que l' $\alpha$ syn soit retrouvée dans les agrégats neuronaux chez les patients atteints de la MP, et l'existence de mutations ponctuelles et de multiplications du gène *SNCA*, causant des formes familiales de la MP, vont dans le sens d'un rôle très important de cette protéine dans la physiopathologie de la MP. De plus, des GWAS ont révélé un polymorphisme mononucléotidique (SNP, pour *single-nucleotide polymorphism*) associé au locus *SNCA* qui accroît le risque de développer une MP sporadique, et est associé à une augmentation du taux d' $\alpha$ syn (Nalls et al. 2014).

### I. La protéine

#### A. Structure : domaines et leurs fonctions

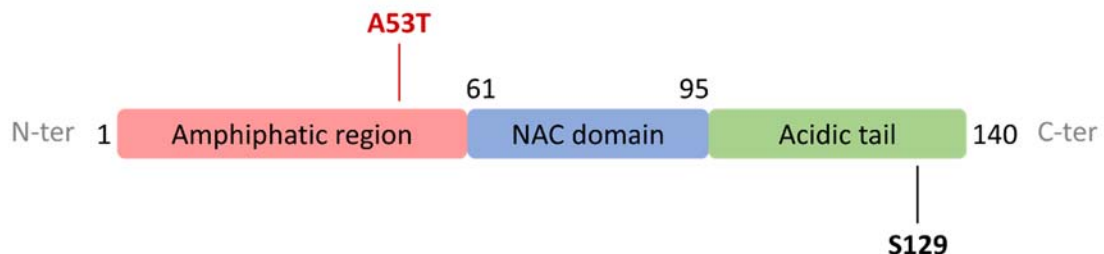


Figure 12. Schéma de l' $\alpha$ syn et de ses différents domaines. Adapté de Hunn et al., 2015.

L' $\alpha$ syn est une protéine de 140 acides aminés (AA) qui contient 3 domaines fonctionnels potentiels (Figure 12). Le domaine N-terminal (N-ter) (AA 1-60) (Dikiy et Eliezer 2014; Fauvet et al. 2012; Trexler et Rhoades 2012) est caractérisé par des répétitions imparfaites riches en lysines supposées former des hélices amphipathiques lors de son interaction avec des lipides (L. Maroteaux, Campanelli, et Scheller 1988). Toutes les mutations autosomiques dominantes de l' $\alpha$ syn identifiées à ce jour sont localisées dans ce domaine N-terminal, ce qui laisse supposer que l'altération de cette région est pathogène. Les mutations A30P et A53T diminuent l'affinité de l' $\alpha$ syn pour les membranes phospholipidiques, donc il est probable que le domaine N-ter de l' $\alpha$ syn intervienne dans sa liaison aux

membranes (Robotta et al. 2017). De plus, il est intéressant de noter que l'asyn de rongeur contient physiologiquement une thréonine à la position 53 (A53T), qui serait donc pathogène spécifiquement chez l'homme (Bendor et al. 2013). En dehors de cet AA 53, 6 autres sur les 140 AA composant l'asyn diffèrent également entre le rongeur et l'Homme (Figure 13). Les AA 61 à 95 constituent le composant non-bêta-amyloïde hydrophobe des plaques amyloïdes (NAC, pour *non-amyloid bêta component*), qui contient une séquence (AA 71-82) nécessaire et suffisante à l'agrégation de l'asyn sous forme de fibrilles riches en feuillets bêta semblables à celles retrouvées dans le cerveau des patients atteints de la MP (Giasson et al. 2001; Spillantini et al. 1998). Le domaine C-terminal (C-ter) est très acide et non structuré à la fois quand l'asyn est liée aux lipides et quand elle est agrégée sous forme de fibrilles. Il est le lieu de plusieurs modifications post-traductionnelles (MPT) de l'asyn.

```

Alignment of Sequence_1: [asyn_homo sapiens.xprt] with Sequence_2: [asyn_mus musculus.xprt]
Similarity : 138/140 (98,57 %)

Seq_1 1      mdvfmkglskakegsvvaaektkqgvaaagktkegvlyvgsktkegvvhgvatvaektk 60
          |||
Seq_2 1      mdvfmkglskakegsvvaaektkqgvaaagktkegvlyvgsktkegvvhgvtvaektk 60

Seq_1 61      eqvtnvggavvtgvtavaqktvegagsiaaatgfvkdkqlgkneegapqegiledmpvdp 120
          |||
Seq_2 61      eqvtnvggavvtgvtavaqktvegagniaaatgfvkdkqmgkgeegypqegiledmpvdp 120

Seq_1 121     dneayempseegyqdyepa 140
          ::|||
Seq_2 121     gseayempseegyqdyepa 140

```

Figure 13. Alignement des séquences peptidiques de l'asyn humaine (seq\_1) et de l'asyn de souris (seq\_2).

## B. Modifications post-traductionnelles (MPT)

L'asyn peut être phosphorylée au niveau des sérines 87 et 129, et des thréonines 125, 133 et 136 (Zhang, Li, et Li 2019), mais la plus étudiée de ses MPT est la phosphorylation de la S129. Elle est souvent utilisée comme marqueur de la pathologie liée à l'asyn car, si on ne retrouve qu'environ 4% de pS129 asyn dans le cerveau sain, 90% de l'asyn contenue dans les CL est phosphorylée sur ce résidu (Anderson et al. 2006; Fujiwara et al. 2002). Il a également été montré par des méthodes de biochimie qu'il y avait une forte augmentation de la pS129-asyn soluble et insoluble dans le cortex frontal et le putamen de patients parkinsoniens (Zhou et al. 2011). Certaines protéines kinases capables de moduler la phosphorylation de ce résidu ont été identifiées, dont les kinases de type Polo (*polo-like kinases*), les caséines kinases et les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (Cresto et al, 2019). Il a également été envisagé que l'asyn soit un substrat de LRRK2, mais d'après les études qui se sont intéressées à cette

question, il est peu probable que LRRK2 phosphoryle directement l'αsyn (Herzig et al., 2012; Lin et al., 2009).

L'étude de l'impact de la phosphorylation de l'αsyn au niveau de sa S129 sur son agrégation et sa toxicité a donné des résultats contradictoires (Buck et al. 2015; Chen et Feany 2005; Gorbatyuk et al. 2008; Khodr et al. 2012; Oueslati et al. 2013; Sato et al. 2011; da Silveira et al. 2009; Smith, Margolis, et al. 2005). Le rôle exact de cette MPT n'est donc pas très bien compris, mais il semblerait qu'elle régule la structure, la liaison aux membranes, l'agrégation, la neurotoxicité et la distribution subcellulaire de l'αsyn (González et al. 2019). Il a également été suggéré que la pS129-αsyn serait dégradée par le protéasome, ce qui pourrait indiquer un rôle de cette MPT de l'αsyn dans son adressage aux systèmes de dégradation (Machiya et al. 2010). Comme l'αsyn présente dans les CL est phosphorylée (Fujiwara et al. 2002), on pourrait imaginer qu'elle ait été adressée aux systèmes de dégradation, mais que cette dernière n'aurait pas eu lieu. Cette hypothèse est corroborée par le fait que l'αsyn présente dans le CL et les NL colocalise également avec l'ubiquitine (Burré, Sharma, et Südhof 2018), et l'ubiquitination est justement un mécanisme permettant l'adressage des protéines au protéasome pour dégradation.

D'autre part, des formes tronquées en C- ou en N-terminal de l'αsyn ont été retrouvées dans les cerveaux de personnes saines comme dans ceux de personnes atteintes de la MP. En effet, si les CL contiennent en majorité de l'αsyn entière, ils contiennent également de petites quantités d'αsyn tronquée en Cter (Burré et al. 2018). La troncation en C-ter de l'αsyn augmente sa capacité à s'agréger *in vitro* (Hoyer et al. 2004). Une augmentation significative du ratio αsyn tronquée/αsyn totale a été montrée dans le cerveau de souris transgéniques surexprimant l'αsyn A53T humaine (Li et al. 2005). Cette MPT pourrait donc aussi être impliquée dans la physiopathologie de la MP. La nitration de l'αsyn au niveau des tyrosines 125, 133 et 136 a également été rapportée comme augmentant la formation de fibres ou d'oligomères d'αsyn (Longhena et al. 2019) et les CL sont positifs pour l'αsyn nitrée (Giasson et al. 2000).

D'autres MPT de l'αsyn ont été identifiées, qui elles seraient plutôt liées à des mécanismes bénéfiques dans la MP. Il a notamment été montré que l'αsyn pouvait être acétylée au niveau N-ter, par l'attachement d'un groupe acétyle au premier AA de l'αsyn. Cette acétylation a été observée à la fois chez des patients et des individus sains, et elle augmente sa propension à former des hélices alpha, son affinité pour les membranes, et sa résistance à l'agrégation (Burré 2015). L'αsyn peut également subir des O-N-acétylglucosaminylations (O-GlcNAcylation). C'est une forme de glycosylation dynamique qui consiste en l'addition d'un résidu unique de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Il a été montré que cette MPT pouvait inhiber l'agrégation de l'αsyn (Levine et al. 2019). Un autre type de MPT est la sumoylation, le processus par lequel des protéines SUMO (*Small Ubiquitin-like mOdifier*) sont attachées de manière covalente à des résidus lysine par un pont thioester. L'αsyn contient un grand nombre de résidus lysine pouvant être la cible de ce



type de modification post-traductionnelle, et il semblerait que ce processus soit plutôt protecteur contre la toxicité de l'αsyn (González et al. 2019).

L'αsyn peut donc subir une large gamme de MPT. Certaines seraient plutôt associées à des mécanismes pathologiques (phosphorylation, ubiquitination, nitration, troncation C-ter) alors que d'autres seraient plutôt protectrices (acétylation, O-N-acétylglucosaminylation, sumoylation).

### C. Expression et localisation

Au niveau tissulaire, la protéine αsyn est majoritairement retrouvée dans le cerveau, ainsi que la moelle osseuse et les reins (Figure 14). Cependant l'ARNm est majoritairement retrouvé dans le cerveau. On pourrait donc supposer que la protéine retrouvée au niveau périphérique proviendrait en partie du cerveau.

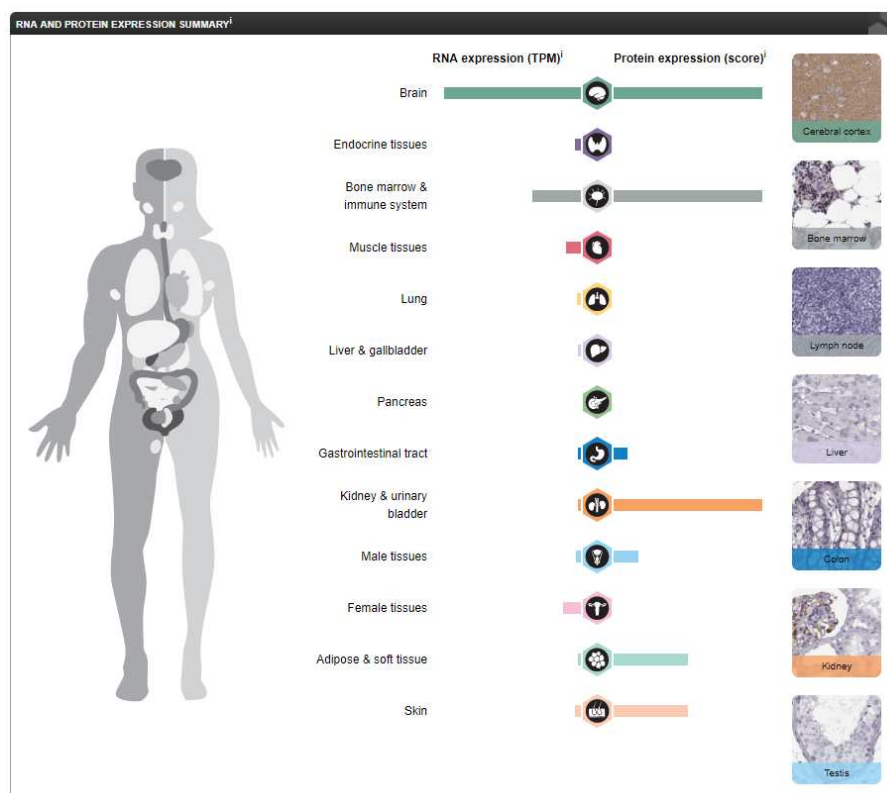


Figure 14. Expression tissulaire de l'ARNm et de la protéine dérivés du gène SNCA chez l'homme. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000145335-SNCA/tissue>

Les synucléines ont initialement été identifiées dans des préparations de vésicules cholinergiques purifiées à partir de l'organe électrique de la raie *Torpedo* (L. Maroteaux et al. 1988). Leur présence à la pré-synapse a ensuite été confirmée par plusieurs études (George et al. 1995; Iwai et al. 1995;

Maroteaux et Scheller 1991; Murphy et al. 2000). La localisation synaptique de l' $\alpha$ syn pourrait aussi s'expliquer par son affinité préférentielle pour les membranes de forte courbure (Middleton et Rhoades 2010). En effet, les vésicules synaptiques font partie des plus petites membranes biologiques décrites (elles ont donc une forte courbure). L' $\alpha$ syn est donc localisée spécifiquement aux terminaisons nerveuses, dans le système nerveux central et périphérique, et il y en a peu dans le corps cellulaire, les dendrites, ou dans d'autres sites extrasynaptiques le long des axones (George et al. 1995; Iwai et al. 1995). Maroteaux et collaborateurs avaient également proposé une localisation nucléaire de l' $\alpha$ syn, qui est depuis controversée car des résultats contradictoires ont été obtenus (Huang et al. 2011; Spillantini et al. 1998). Il est possible que ces différences soient dues à l'utilisation de différents anticorps entre les études. La comparaison chez la souris de différents anticorps marquant l' $\alpha$ syn a montré que ceux qui marquaient le noyau le marquaient également chez des souris KO pour l' $\alpha$ syn, ce qui irait plutôt dans le sens d'un problème de spécificité des AC que d'une réelle localisation nucléaire de l' $\alpha$ syn (Huang et al. 2011). En utilisant un système de photoactivation, Gonçalves et Outeiro ont montré que l' $\alpha$ syn WT était distribuée dans le cytoplasme et le noyau de cellules H4 (lignée issue d'un neurogliome humain) et que sa localisation nucléaire nécessitait que son extrémité N-terminale soit libre (sans tag) (Gonçalves et Outeiro 2013).

Au niveau cellulaire, l' $\alpha$ syn a plutôt une expression neuronale, mais elle est aussi retrouvée dans d'autres types cellulaires, comme les astrocytes ou les cellules hématopoïétiques (Cookson 2009).

Chez les rongeurs, l'expression des ARNm de l' $\alpha$ syn commence à des stades tardifs du développement embryonnaire, atteint un pic au cours des premières semaines post-natales puis diminue. La quantité de protéine augmente au cours du développement et reste élevée à l'âge adulte, ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle de son expression (Burré 2015).

## **II. Fonctions physiologiques**

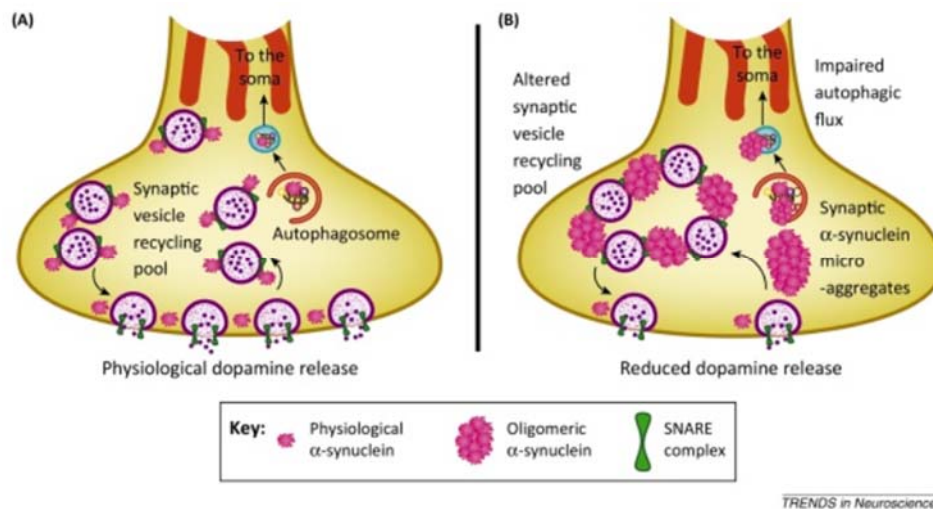
La localisation préférentielle de l' $\alpha$ syn au niveau pré-synaptique semble indiquer des fonctions plus particulièrement dans la neurotransmission. Elle serait en particulier impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire et la libération des NT. En effet, la libération de DA est augmentée chez les souris déficientes en  $\alpha$ syn sans modification du taux de DA tissulaire (Abeliovich et al. 2000; Senior et al. 2008), ce qui suggère un rôle, direct ou indirect, de l' $\alpha$ syn dans la libération de la DA et va dans le sens d'une implication de l' $\alpha$ syn dans l'exocytose des vésicules synaptiques. D'autre part, la suppression de l'expression de l' $\alpha$ syn dans des neurones primaires via des oligonucléotides antisens induit une réduction significative du pool distal de vésicules synaptiques (Murphy et al. 2000). Cela pourrait confirmer le rôle de l' $\alpha$ syn dans le contrôle de l'exocytose des vésicules synaptiques car, à l'inverse, la

présence de l'αsyn à la synapse accélère la cinétique des événements d'exocytose individuels, et cette fonction est altérée par les mutations liées à la MP (Logan et al. 2017).

Plus précisément, dans des cellules de mammifères et *in vitro*, l'αsyn faciliterait de manière dose-dépendante l'assemblage du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*) (Burré et al. 2010). Lors de l'exocytose, les protéines membranaires des vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane, et ce complexe est impliqué dans ce phénomène pour permettre la libération de NT. L'αsyn interviendrait plutôt avant ou au moment de la fusion avec les membranes, puisqu'elle se détache des vésicules lorsque celles-ci fusionnent avec la membrane (présentation de Robert Edwards, World Parkinson Congress 2019, Kyoto). Le maintien des conformations correctes des protéines du SNARE est assuré par plusieurs chaperonnes, dont CSPα (*cystein-string-protein alpha*). Il a été montré que l'αsyn monomérique coopérerait avec la CSPα présynaptique, afin de maintenir l'assemblage du complexe SNARE (Chandra et al. 2005) et pourrait se comporter comme une chaperonne moléculaire (Chandra et al. 2005; Souza et al. 2000). L'αsyn faciliterait également l'endocytose des vésicules après la libération synaptique des NT (Vargas et al. 2014). En conditions physiologiques, l'αsyn participerait donc à la fusion des vésicules synaptiques - en facilitant leur fusion à la membrane et la libération de NT – ainsi qu'à l'endocytose et au recyclage de ces vésicules (Figure 15A).

Ces données concernant les fonctions de l'αsyn sont renforcées par l'étude de la pathologie liée à cette protéine. En effet, en conditions pathologiques, les gros oligomères d'αsyn perturberaient la formation du complexe SNARE et l'augmentation des taux d'αsyn altérerait la libération des NT en diminuant la taille du pool de vésicules synaptiques de recyclage (Wong et Krainc 2017). *In vitro* dans des neurones primaires d'hippocampe de souris, la surexpression de l'αsyn WT humaine (à un niveau qui se veut proche de ce que qu'on pourrait retrouver chez des patients avec une duplication ou une triplication de *SNCA*) entraîne une inhibition de l'exocytose des vésicules synaptiques sans toxicité neuronale apparente (Nemani et al. 2010). Cet effet est également retrouvé lors de l'exposition de neurones primaires de cortex de rat à de l'αsyn recombinante humaine, qui entraîne une diminution de l'activité neuronale et de la synchronisation du déclenchement des potentiels d'action (Hassink et al. 2018). L'augmentation de l'expression de l'αsyn WT par l'injection d'un AAV dans la SNpc chez le rat entraîne également une diminution de la libération et de la recapture de la DA, probablement via un dysfonctionnement des DAT (Lundblad et al. 2012). Chez des souris transgéniques BAC, l'effet de la surexpression de l'αsyn sur la libération de DA précède la formation d'agrégats d'αsyn et la dégénérescence des neurones de la SNpc (Janezic et al. 2013). Ces données confirment le rôle physiologique de l'αsyn dans la régulation du trafic vésiculaire, et laissent supposer que la fonction

normale de l' $\alpha$ syn serait altérée dans les synucléinopathies, empêchant le bon fonctionnement de l'exocytose et de l'endocytose des vésicules synaptiques et donc la libération des NT (Figure 15B).



**Figure 15. Rôle de l' $\alpha$ syn à la synapse.** (A) En conditions physiologiques, l' $\alpha$ syn participerait à la libération de la DA en aidant à l'assemblage et au maintien des complexes SNARE, en agissant comme chaperonne moléculaire en coopération avec les protéines CSP $\alpha$ . (B) En revanche, les formes pathologiques de l' $\alpha$ syn perturberaient la physiologie des synapses et altèreraient la libération des neurotransmetteurs, notamment la DA. (Hunn et al. 2015)

### III. Pathologie liée à l' $\alpha$ syn

En conditions physiologiques, l' $\alpha$ syn est localisée aux terminaisons synaptiques, mais en conditions pathologiques on retrouve des oligomères et des agrégats dans le corps cellulaire et les neurites. Dans la pathologie, l' $\alpha$ syn pourrait donc altérer des fonctions cellulaires au-delà des terminaisons présynaptiques (Wong et Krainc 2017).

La pathologie liée à l' $\alpha$ syn est très étudiée chez le rongeur, et ces modèles apportent de nombreux éléments de réponse quant aux mécanismes possibles de toxicité de l' $\alpha$ syn. Les souris déficientes en  $\alpha$ syn sont viables, et ne présentent pas de phénotype fonctionnel majeur (Abeliovich et al. 2000). Il existe une forte redondance entre l'alpha, la bêta et la gamma synucléine, et les souris triple KO pour les 3 synucléines ont un phénotype beaucoup plus marqué que les souris  $\alpha$ syn KO, avec une mortalité précoce et des déficits moteurs (Burré et al. 2010). Il est donc possible que la bêta et la gamma synucléine compensent la perte de l' $\alpha$ syn chez les animaux  $\alpha$ syn KO, limitant leur phénotype.

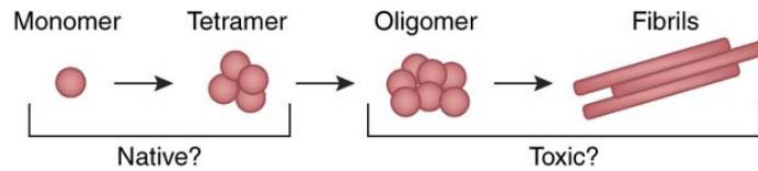
La surexpression de mutants de l' $\alpha$ syn dans des modèles transgéniques peut également induire une neurodégénérescence (Giasson et al. 2002; Lee et al. 2002), par contre les modèles transgéniques surexprimant l' $\alpha$ syn humaine sauvage n'en présentent généralement aucune (Bendor et al. 2013;

Masliah et al. 2000; van der Putten et al. 2000). La surexpression de l' $\alpha$ syn par l'injection de vecteurs viraux directement dans le cerveau des rongeurs permet en revanche d'induire une mort cellulaire significative associée à des agrégats d' $\alpha$ syn (Cookson 2009; Kirik et al. 2002). Comme il a été dit précédemment, la synucléine de rongeur contient physiologiquement une thréonine à la position 53 (A53T) (Bendor et al. 2013). Malgré cela, les rongeurs ne développent pas spontanément d'agrégats d' $\alpha$ syn ni de neurodégénérescence de la SN au cours de leur vieillissement. Il serait donc possible que l' $\alpha$ syn endogène rongeur atténue la toxicité de l' $\alpha$ syn humaine. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le croisement de souris transgéniques surexprimant l' $\alpha$ syn A53T humaine avec des souris sans  $\alpha$ syn endogène ( $\alpha$ syn KO) aggrave le phénotype par rapport aux souris transgéniques qui expriment l' $\alpha$ syn endogène (Cabin et al. 2005; Gao et al. 2008). Cela expliquerait les phénotypes modestes observés dans les animaux transgéniques. De plus, la SNpc des rongeurs est dépourvue de NM, qui est une caractéristique importante des neurones de la SNpc chez l'homme. L'absence chez le rongeur de ce facteur de vulnérabilité pourrait également atténuer la toxicité de l' $\alpha$ syn dans ces modèles.

#### **A. Les différentes formes d' $\alpha$ syn**

L' $\alpha$ syn n'a pas de structure tridimensionnelle définie en solution. C'est une protéine dynamique, que l'on peut retrouver sous différentes conformations dans les cellules, et en conditions physiologiques, elle est en équilibre entre une forme soluble et une forme liée aux membranes (Burré et al. 2018).

Lors de son association aux membranes, elle adopte une conformation en hélices, alors que sa structure est riche en feuillets bêta dans les agrégats (Bendor et al. 2013). L'agrégation de l' $\alpha$ syn passe par plusieurs intermédiaires qui précèdent la formation de fibrilles et leur dépôt dans des corps d'inclusion (Figure 16). En conditions physiologiques, l' $\alpha$ syn existe donc sous forme de monomères qui peuvent s'associer en multimères (notamment des tétramères) (Wong et Krainc 2017). Il a été suggéré qu'un équilibre dynamique existerait entre ces monomères désordonnés et les multimères d' $\alpha$ syn, et qu'une altération de cet équilibre pourrait promouvoir l'agrégation de l' $\alpha$ syn (Dettmer et al. 2015). En effet, les monomères d' $\alpha$ syn peuvent s'assembler pour former des oligomères solubles, puis des fibrilles insolubles (Wong et Krainc 2017). Les oligomères sont constitués de 10-50 monomères d' $\alpha$ syn alors que les fibres, qui font plus de 0,1  $\mu$ m de long sont formées par plusieurs milliers de chaînes polypeptidiques (Melki 2015). Les mutations ponctuelles de l' $\alpha$ syn (comme la mutation A53T) augmentent le nombre de conformations qu'elle peut adopter, et potentiellement la persistance dans les cellules des conformations capables de s'assembler, ce qui favorise l'agrégation de l' $\alpha$ syn (Alam et al. 2019).



**Figure 16. Les différentes conformations de l'αsyn** (Wong et Krainc 2017).

Il est difficile d'évaluer avec précision qu'elle(s) forme(s) de l'αsyn est/sont pathologique(s). La charge en CL ne corrèle pas bien avec la mort neuronale ni la gravité de la pathologie. De plus, on retrouve également des CL chez des individus asymptomatiques, et certains patients parkinsoniens ne présentent pas ces corps d'inclusion, ce qui laisse penser que les CL en eux-mêmes ne seraient pas délétères (Mor, Daniels, et Ischiropoulos 2019). L'agrégation de l'αsyn pourrait très bien être protectrice plutôt que toxique, et alors ce serait d'autres espèces d'αsyn que les agrégats, par exemple les oligomères, qui seraient responsables de la toxicité. Par contre, il est globalement accepté qu'une augmentation de l'expression de l'αsyn normale est délétère, puisque les triplications pathogènes de *SNCA* induisent des formes particulièrement sévères de la MP (Singleton 2005). Les patients avec cette triplication de *SNCA* présentent deux fois plus d'αsyn dans le sang. Au niveau cérébral par contre, ils présentent une forte augmentation de l'ARNm codant pour l'αsyn, mais en ce qui concerne la protéine, il y aurait plutôt une augmentation des agrégats que de la protéine soluble (Miller et al. 2004). Cependant, on ne sait pas si l'augmentation de la quantité d'αsyn est directement toxique ou si elle augmente la probabilité que des conformations pro-agrégantes pathogènes soient générées.

Depuis plusieurs années, la mise à disposition d'espèces synthétiques de l'αsyn a permis d'étudier plus en détail la question de sa toxicité. Il est en effet possible de générer *in vitro* différentes conformations de l'αsyn (Bousset et al. 2013), et ces espèces synthétiques peuvent former des agrégats de structure semblable à celle des inclusions retrouvées chez les patients (Peelaerts et al. 2018), ce qui souligne la pertinence de leur emploi pour disséquer les mécanismes de la pathologie liée à l'αsyn. Plusieurs études ont donc utilisé ces espèces synthétiques pour essayer de mieux comprendre si c'était les oligomères solubles d'αsyn qui étaient toxiques dans la MP, ou si c'était plutôt les fibres insolubles.

L'expression virale de variants d'αsyn qui présentent une oligomérisation accrue dans la SN de rats induit la perte des neurones DA (Winner et al. 2011). De plus, l'exposition de cultures primaires de neurones corticaux à des oligomères extraits des cerveaux de souris transgéniques A53T induit une toxicité qui n'est pas retrouvée lorsque les extraits sont déplétés en αsyn (Tsika et al. 2010). Les données chez l'Homme vont également dans le sens d'une toxicité de ces oligomères, car des oligomères solubles d'αsyn de haut poids moléculaire ont été extraits de cerveaux humains et sont plus nombreux chez les patients atteints de la MP (Sharon et al. 2003). De forts taux de ces oligomères ont également été

retrouvés dans le liquide céphalorachidien de patients en comparaison avec des sujets sains (El-Agnaf et al. 2006; Park et al. 2011).

Tous ces éléments semblent indiquer un rôle toxique des oligomères solubles d'αsyn mais d'autres études suggèrent que ce seraient plutôt les fibres qui seraient toxiques. Il a notamment été suggéré que les fibres d'αsyn seraient 1000 fois plus toxiques que leurs précurseurs (Pieri et al. 2012), et l'injection de différentes formes d'αsyn dans la SNpc de rats a montré que c'étaient les fibrilles plutôt que les oligomères qui induisaient les plus fortes altérations motrices et synaptiques ainsi que la plus forte perte de neurones dopaminergiques (Peelaerts et al. 2015). Il a également été suggéré que les fibres d'αsyn pourraient induire la mort cellulaire par un processus appelé "parthanatos" (Kam et al. 2018).

Cependant, comme les fibres et leurs précurseurs oligomériques sont en équilibre, il est possible que les oligomères s'assemblent en fibres au cours des expérimentations ou que les fibres soient désassemblées, ce qui rend très complexe l'interprétation de toutes ces données et la comparaison de la toxicité de ces deux espèces.

Un autre niveau de complexité dans cette question de la toxicité des différentes formes de l'αsyn découle du fait que l'on peut obtenir (à partir du même précurseur) des agrégats de structure et de cytotoxicité différentes selon leurs conditions de formation : les fibres et les rubans. Ainsi, les fibres d'αsyn se lient plus aux cellules que les rubans et induisent une plus forte mort cellulaire à des concentrations équivalentes. Les rubans entraînent la formation de plus d'inclusions que les fibres (Bousset et al. 2013). *In vivo*, les fibres entraînent la formation de structures semblables aux CL alors que les rubans induisent plutôt la formation d'inclusions cytoplasmiques dans les oligodendrocytes (ce qui est caractéristique de la MSA) (Peelaerts et al. 2015). Cette diversité est aussi retrouvée au sein des oligomères, qui peuvent différer en structure, poids moléculaire et morphologie (Alam et al. 2019). Il est donc difficile d'établir précisément quelles espèces de l'αsyn sont pathogènes dans la MP, de par leur diversité et leur évolution dynamique. Les différentes espèces de l'αsyn sont revues en détails dans Alam et al., 2019.

## **B. Propagation**

Plusieurs observations supportent l'hypothèse que l'αsyn pourrait se propager de cellules à cellules selon un mécanisme semblable à celui du Prion (Brundin, Melki, et Kopito 2010). En effet, les premiers arguments viennent du travail de Braak et collaborateurs. Sur la base d'autopsies, ils ont montré que les CL se développaient d'abord dans des régions cérébrales spécifiques, puis progressaient d'une manière prévisible sur le plan topographique en suivant les connexions anatomiques entre les

différentes régions cérébrales (Braak et al. 2003). Par la suite, cette idée a été confortée par des études visant à restaurer le pool de neurones DA par la greffe de cellules fœtales dopaminergiques saines. En effet, à la mort des patients, plusieurs années après la greffe, les greffons ont été étudiés et ont montré la présence de CL (Kordower et al. 2008; Li et al. 2008; Olanow et al. 2019). Ceci suggère une propagation de la pathologie, mais ne permet pas de différencier entre la propagation directe de l'αsyn ou bien la transmission au greffon des conditions pathologiques responsables de l'agrégation de l'αsyn endogène. Par la suite, de nombreuses études *in vivo* ou *in vitro* ont eu pour but de prouver la propagation de la pathologie et son mécanisme.

*In vivo* chez des souris transgéniques surexprimant l'αsyn A53T, l'injection dans le ST de fibrilles d'αsyn recombinante ou d'homogénats de cerveaux de souris tg A53T âgées induit la formation d'agrégats d'αsyn ainsi qu'une neurodégénérescence rapide dans la SNpc, alors qu'aucun de ces 2 phénomènes n'est observé chez les souris KO pour l'αsyn (Desplats et al. 2009; Luk et al. 2012; Mougenot et al. 2012). Ceci suggère que les fibrilles d'αsyn sont toxiques chez l'animal, et que cette toxicité passe probablement par une interaction avec l'αsyn endogène puisque la présence de cette dernière est nécessaire à la toxicité.

*In vitro* il a été montré que les cellules pouvaient incorporer l'αsyn fibrillaire, et que cette dernière pouvait ensuite induire l'agrégation de la protéine endogène (Freundt et al. 2012; Gribaudo et al. 2019; Luk et al. 2009; Volpicelli-Daley et al. 2011). Une propagation des espèces synthétiques de l'αsyn a été confirmée dans des cellules humaines cultivées dans des chambres de microfluidique. En effet, dans la chambre proximale, l'exposition de neurones corticaux dérivés d'iPSC de personnes saines à des fibres ou des rubans d'αsyn entraîne la formation d'inclusions positives pour la pS129-αsyn dans les neurones sains de la chambre distale, qui eux n'ont pas été exposés aux fibres et rubans. Cet effet sur l'αsyn endogène n'est pas empêché par l'usage de fibres/rubans présentant la mutation S129A (qui ne peut pas être phosphorylée), ce qui va à l'encontre d'un rôle de cette phosphorylation dans la propagation de l'αsyn (Gribaudo et al. 2019).

Il a également été suggéré que l'αsyn pourrait se propager depuis la périphérie jusqu'au système nerveux central. En effet, après l'injection d'un AAV codant pour l'αsyn humaine dans le nerf vague de rats, de l'αsyn humaine a été retrouvée dans le bulbe rachidien, puis dans le mésencéphale et dans le cerveau antérieur (Ulusoy et al. 2015). Ce transfert était plus efficace dans les neurones sains que dans les neurones en souffrance, ce qui suggère un transfert actif de l'αsyn plutôt qu'une libération par les neurones en souffrance (Ulusoy et al. 2015; Vargas, Grudina, et Zurzolo 2019). Van Den Berg et collaborateurs ont également montré une propagation de l'αsyn après l'injection de fibres d'αsyn humaine dans le duodénum et le pylore de rats BAC transgéniques surexprimant l'αsyn, mais sans



neurodégénérescence (Van Den Berge et al. 2019). Comme l'αsyn de rongeur présente physiologiquement une thréonine en position 53, alors que cette mutation est pathogène chez l'homme, il est probable que la physiologie de l'αsyn de rongeur soit légèrement différente de la nôtre. Une étude récente a étudié la propagation de l'αsyn de souris chez la souris, afin de prendre ce facteur en compte. Ils ont ainsi montré que l'injection de fibres préformées d'αsyn de souris dans le duodénum et le pylore de souris (innervés par le nerf vague) entraînait en quelques mois l'apparition de cellules positives pour l'αsyn pS129 dans différentes régions cérébrales selon un schéma suivant les stades proposés par Braak et collaborateurs (Braak et al. 2003). Cette pathologie était notamment associée à une perte significative des neurones dopaminergiques de la SNpc et des altérations motrices dès 7 mois (Kim et al. 2019). Les mêmes injections n'entraînaient pas de pathologie chez des animaux SNCA<sup>-/-</sup> ou ayant subi une vagotomie, ce qui suggère que la pathologie se transmet par le nerf vague et nécessite la présence de la protéine endogène (Figure 17) (Kim et al. 2019). Une autre étude récente a cartographié de manière quantitative la pathologie induite par l'injection de fibres préformées d'αsyn dans le striatum dorsal de souris. Ils ont ainsi pu montrer que la propagation de l'αsyn mal conformée était corrélée positivement avec deux caractéristiques cérébrales importantes : la connectivité anatomique et le taux d'expression de l'αsyn (Henderson, Cornblath, et al. 2019).

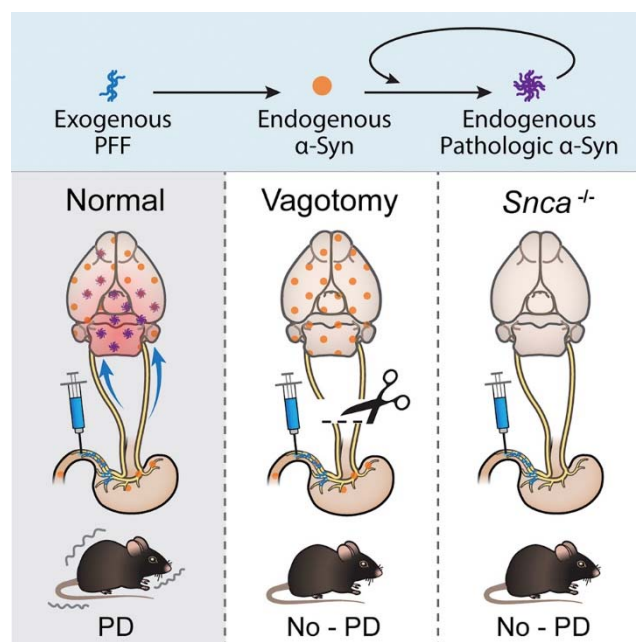


Figure 17. Résumé graphique des résultats obtenus dans l'étude de Kim et al., 2019.

Si ces arguments sont en faveur d'une propagation de l'αsyn, il est important de noter que les preuves cliniques d'un tel phénomène restent limitées, et que certains arguments vont contre cette idée. En effet, si quelques cellules de certains greffons de patients développent des CL, la plupart des autres cellules de ces greffons et la plupart des greffes en général sont totalement normales (Hallett et

al. 2014; Mendez et al. 2008) (Revu par Engelender and Isacson, 2017). Il serait aussi possible que l'agrégation d'αsyn dans les greffons soit induite sous l'effet de l'environnement cérébral pathologique sur l'αsyn endogène au greffon plutôt que par une réelle propagation. De plus, par opposition avec les différentes études montrant une propagation par la surexpression d'αsyn ou l'injection de fibres ou d'homogénats de cerveau dans le cerveau de rongeurs, une équipe a montré que l'inoculation de fibres préformées d'αsyn dans le côlon de rats ou de PNH n'induisait pas de propagation significative de l'αsyn (Manfredsson et al. 2018).

En ce qui concerne les mécanismes de cette propagation, différentes voies de transmission de l'αsyn ont été suggérées (Figure 18). Lee et collaborateurs ont montré que de petites quantités d'αsyn pouvaient être sécrétées par une exocytose de vésicules (Lee, Patel, et Lee 2005), ce qui pourrait constituer un premier mécanisme de propagation. La libération d'αsyn pourrait également passer par des exosomes (Bendor et al. 2013). De l'αsyn a été retrouvée dans le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) de personnes saines ainsi que de patients, ce qui irait dans le sens d'une libération de l'αsyn dans le milieu extracellulaire (Angot et al. 2010). De plus, une étude *in vitro* dans des cellules SH-SY5Y différenciées a montré que l'αsyn pouvait être libérée dans le milieu de culture par exocytose (Lee et al. 2005). Les fibres d'αsyn induisent une rupture des vésicules intracellulaires, ce qui va aussi dans le sens d'une propagation par ces mécanismes (Flavin et al. 2017). Il est aussi possible que les neurones qui meurent relarguent des formes pathogènes de l'αsyn (Melki 2018). Une fois sécrétée par l'un ou l'autre de ces mécanismes, l'αsyn pourrait donc être prise en charge par les cellules environnantes. Il a été montré que l'αsyn interagissait directement avec les lipides ou les protéines de la membrane plasmique, ce qui pourrait faciliter son internalisation (Vargas et al. 2019). *In vitro*, les fibres et les oligomères d'αsyn pourraient être internalisés par endocytose, car après internalisation les fibres d'αsyn colocalisent avec des marqueurs des endosomes (Desplats et al. 2009; Lee et al. 2008).

Le transfert de l'αsyn pourrait également passer par des nanotubes, qui établissent des connexions transitoires directes entre les cellules (Vargas et al. 2019). En effet, il a été montré que des fibres d'αsyn pouvaient être internalisées par des neurones primaires, dirigées vers le compartiment lysosomal, et être transférées vers une autre cellule au sein de vésicules lysosomales, via des nanotubes (Abounit et al. 2016). Cependant, l'existence de ces nanotubes est controversée, car ils n'ont été observés que *in vitro*.

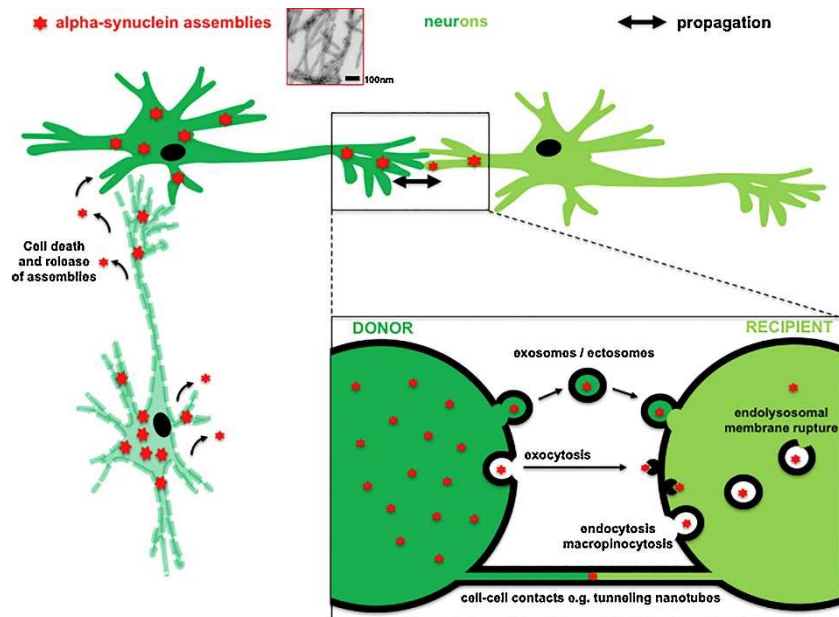


Figure 18. Mécanismes possibles de propagation des espèces pathogènes d'asyn (Melki 2018).

#### IV. Conclusion

L'asyn est donc une protéine pré-synaptique se liant aux membranes et qui permet de faciliter le trafic des vésicules synaptiques. Elle existe sous différents états qui sont en équilibre dynamique. En conditions pathologiques, un déséquilibre en faveur de formes toxiques pourrait induire une perte de ses fonctions physiologiques et un gain de fonctions délétères, aboutissant *in fine* à la formation d'oligomères ou de fibrilles d'asyn. Ces conformations toxiques pourraient propager la maladie au sein du cerveau par un mécanisme semblable à celui du Prion.

## Chapitre III. LRRK2

Comme il a été dit précédemment (cf chapitre I - Etiologie - Formes autosomiques dominantes), les mutations de *LRRK2* sont la cause la plus fréquente des formes génétiques de la MP, mais on les retrouve également chez 3.8% des patients sporadiques (Corti et al. 2011). De plus, il a récemment été montré que LRRK2 était activée (augmentation de la pS1292 et augmentation de pRab10) dans la SNpc de patients atteints de formes sporadiques de la MP (Di Maio et al. 2018). Ces résultats prouvent le rôle capital de l'activité kinase de LRRK2 dans la MP, et soulignent la pertinence de l'emploi d'inhibiteurs de cette activité chez l'ensemble des patients atteints de la MP.

### I. La protéine

#### A. Structure: domaines et leurs fonctions

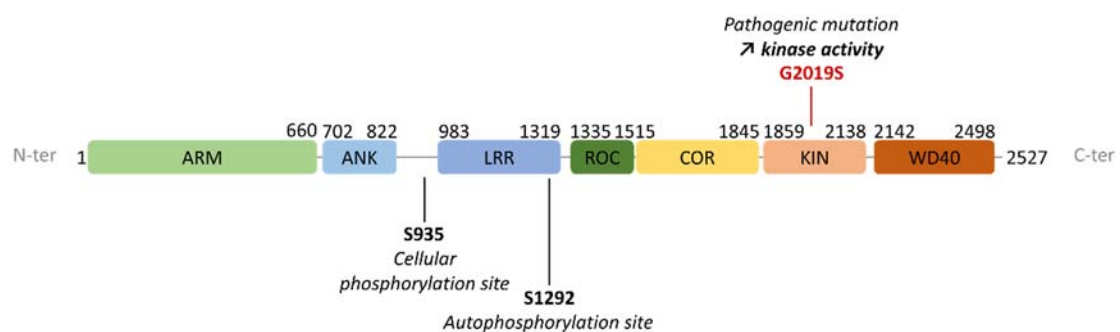


Figure 19. Représentation schématique de LRRK2 et de ses différents domaines. Adapté de De Wit et al., 2018.

LRRK2 est une protéine de 2527 AA (286kDa), constituée de plusieurs domaines (Figure 18). Elle fait partie des protéines de la famille ROCO et elle contient donc un domaine GTPase Roc (*Ras-of-complex proteins*) associé à un domaine COR (*COOH terminal of Roc*) qui permet sa dimérisation (Civiero et al. 2018). LRRK2 possède également un domaine kinase avec une boucle d'activation caractéristique contenant un motif DYG-APE (qui devient DYS-APE avec la mutation G2019S). En particulier, le motif DYG servirait de commutateur conformationnel pour contrôler l'activation de LRRK2 (Schmidt et al. 2019). Les autres domaines de LRRK2 sont impliqués dans l'interaction protéine-protéine: un domaine Ankyrine (ANK), un domaine Armadillo (ARM), un domaine riche en lysines (LRR, pour *Leucine-Rich Repeat*) et un domaine WD40 (Cresto, Gardier, et al. 2019). La présence de ces domaines suggère que LRRK2 pourrait également avoir un rôle de support dans l'assemblage de complexes de signalisation multiprotéiques.

La partie C-ter de LRRK2 est nécessaire à son activité kinase, et elle est capable de se dimériser et de s'autophosphoryler en l'absence du fragment N-ter (Greggio et al. 2008; Jaleel et al. 2007). Par contre, la partie N-ter de LRRK2 (AA 1-1287) ne semble pas indispensable à l'activité kinase (Jaleel et al. 2007), mais participerait à la régulation de LRRK2, notamment via la phosphorylation de certains de ses résidus, comme les S910 et 935 (Nichols et al. 2010). Il semblerait que le domaine GTPase ait une influence sur l'activité kinase de LRRK2, mais sa nature n'est pas claire (Martin et al. 2014). Ce que l'on sait, c'est que l'addition de GTP, de GTP non hydrolysable ou de GDP à la protéine LRRK2 purifiée n'a pas d'effet sur son activité kinase. Le domaine GTPase de LRRK2 ne semble donc pas impacter directement sa propre activité kinase (Taymans et al. 2011). Par contre, l'addition de GTP non hydrolysable sur des cellules exprimant LRRK2 entraîne une augmentation significative de l'activité kinase de LRRK2, ce qui semble indiquer une activation de LRRK2 via une autre protéine de manière GTP-dépendante, plutôt qu'une auto-activation par sa propre activité GTPase (Taymans et al. 2011).

Il existe une protéine homologue de LRRK2, LRRK1, dont le domaine LRR est un peu plus court, et qui n'a pas été impliquée dans la MP (Liao et Hoang 2018). Il est cependant intéressant de noter son existence car leur homologie pourrait entraîner un mécanisme compensatoire par LRRK1 dans les modèles déficients en LRRK2.

## **B. Phosphorylation/autophosphorylation**

LRRK2 présente deux regroupements de sites de phosphorylation, un groupe de sites d'autophosphorylation qui ont un taux de phosphorylation basal très faible dans les cellules (T1410, T1503 et S1292), et un groupe de résidus sérine avec des taux de phosphorylation basale élevés (S908, 910, 935, 955, 973 et 976) (Lobbestael et al. 2013).

Parmi les sites de phosphorylation constitutifs de LRRK2, les S910 et 935, situées avant le domaine LRR, sont particulièrement étudiées. Leur phosphorylation est diminuée par les mutations pathogènes de LRRK2, en particulier la mutation G2019S, ainsi que dans les cerveaux de patients atteints de la MP (Dzamko et al. 2017; Li et al. 2011; Nichols et al. 2010). Ce sont des sites de phosphorylation "cellulaire", qui ne sont pas des sites d'autophosphorylation, mais seraient plutôt phosphorylés par d'autres kinases (Li et al. 2011; Nichols et al. 2010; West et al. 2007). Parmi ces protéines, il pourrait y avoir la Protéine Kinase A (PKA) (Li et al. 2011; Muda et al. 2014) et la protéine inhibitrice de la kinase kappaB (IKK, pour inhibitor of kappaB kinase) (Dzamko et al. 2012). La Protéine Phosphatase 1 $\alpha$  (PP1 $\alpha$ ) à l'inverse serait une phosphatase de LRRK2 (Lobbestael et al. 2013). Si la phosphorylation de ces résidus n'est pas proportionnelle à l'activité des mutants de LRRK2 in vitro, c'est un bon indicateur de l'efficacité de l'inhibition de son activité kinase. En effet, il a été montré que les inhibiteurs de LRRK2 ainsi que les

mutations diminuant son activité kinase diminuait fortement la phosphorylation des S935/S910 (Skibinski et al. 2014; Vancaenenbroeck et al. 2014).

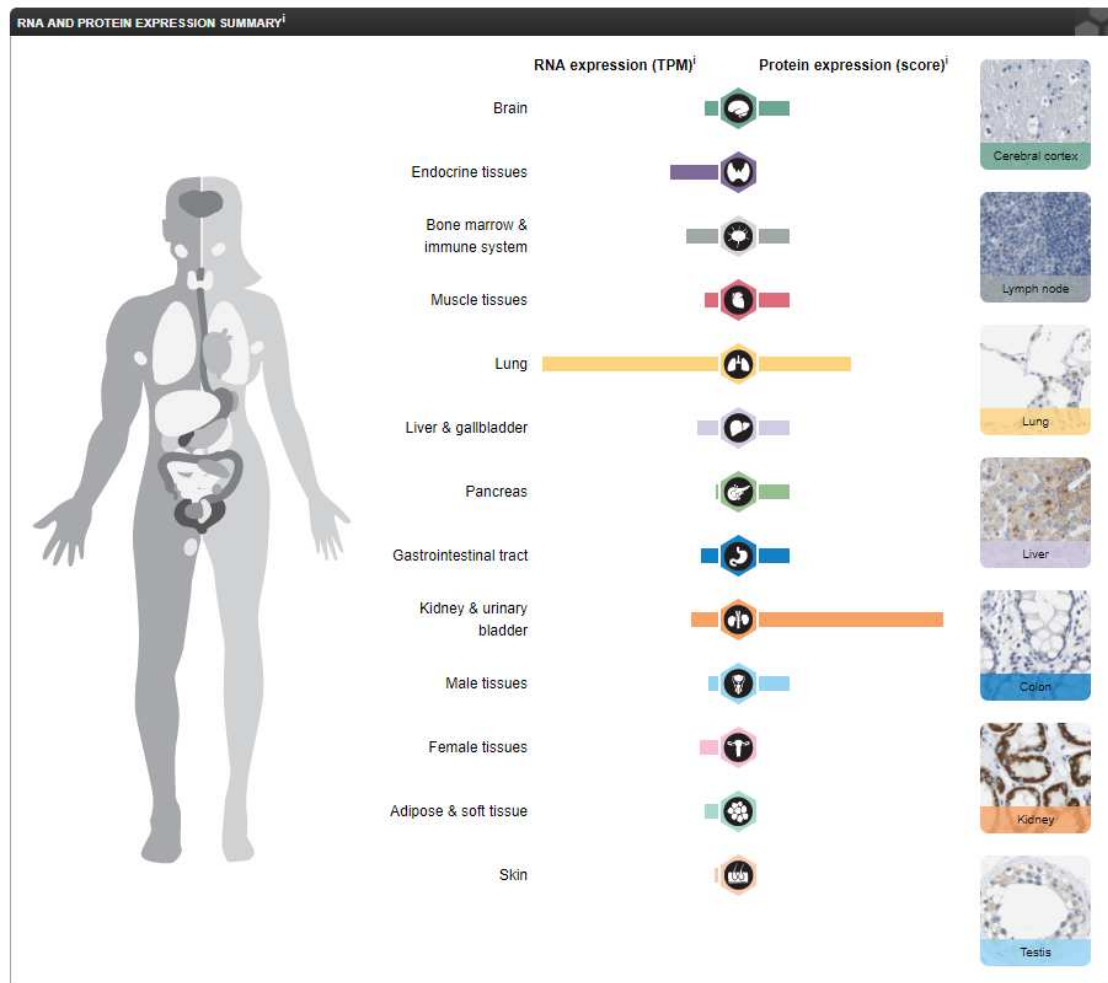
La phosphorylation de ces résidus est nécessaire pour la liaison des protéines 14-3-3, qui contrôlent la localisation cellulaire de LRRK2 (Mamais et al. 2014). Les protéines 14-3-3 sont un groupe de protéines adaptatrices qui participent à de nombreux processus cellulaires. Elles se dimérisent et se lient à leur partenaire au niveau de sites phosphorylés spécifiques (majoritairement des sérines) et participent à la localisation des protéines, leur activité et leur stabilité.

En conditions physiologiques, LRRK2 est majoritairement retrouvée sous forme de dimères capables de s'autophosphoryler (Greggio et al. 2008). En particulier, la S1292, située à la fin du domaine LRR, est un site d'autophosphorylation très étudié, car il a été montré *in vitro* et *in vivo* que sa phosphorylation augmentait proportionnellement à l'activité kinase de LRRK2 (Sheng et al. 2012). A l'inverse, l'inhibition pharmacologique de l'activité kinase de LRRK2 entraîne sa déphosphorylation (Dzamko et al. 2010). Ces arguments en font un bon indicateur de l'activité kinase de LRRK2.

### **C. Expression et localisation**

Chez la souris, l'expression de LRRK2 est détectable dès le développement embryonnaire dans les reins, les poumons et le cœur. Elle devient détectable dans le SNC après la naissance et atteint son maximum environ 6 semaines après la naissance. Dans le cerveau des souris adultes, l'expression de LRRK2 est ubiquitaire mais plus importante dans le striatum, le cortex, l'hippocampe, le cervelet, le noyau olfactif antérieur et le tronc cérébral (Giesert et al. 2013). Son niveau d'expression est relativement bas dans la SNpc (West et al. 2014a).

Chez l'homme, LRRK2 est ubiquitaire mais s'exprime à un fort taux dans les reins et les poumons, et son expression cérébrale est relativement faible (Figure 20) (Roosen et Cookson 2016). Dans les neurones, l'ARNm codant pour LRRK2 et la protéine associée sont principalement détectés dans le cortex cérébral, dans le noyau caudé et le putamen, mais on les retrouve aussi, bien que dans une moindre proportion, dans les neurones DA de la SNpc contenant de la NM (Higashi et al. 2007). Si l'expression de LRRK2 est majoritairement neuronale, elle a aussi été détectée dans les cellules microgliales activées, et elle pourrait s'exprimer faiblement dans les macrophages et les oligodendrocytes (Dzamko 2017). Il a été suggéré que le niveau d'expression de LRRK2 serait très bas dans les cellules gliales mais pourrait être augmenté dans certaines conditions pathologiques (Dzamko 2017). LRRK2 a également été détectée dans certaines cellules du système immunitaire au niveau périphérique, en particulier dans les lymphocytes B, ainsi que les monocytes et les cellules dendritiques (Gardet et al. 2010).



**Figure 20. Expression tissulaire de l'ARNm et de la protéine dérivés du gène LRRK2 chez l'homme.**  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188906-LRRK2/tissue>

Au niveau cellulaire, LRRK2 est une protéine cytosolique (Smith, Pei, et al. 2005), qui a été localisée dans les endosomes et les lysosomes dans le cerveau de rongeur (Biskup et al. 2006:2006), et dans des structures vésiculaires dans le cerveau humain (Higashi et al. 2007). Cela suggère un rôle de LRRK2 dans les voies endosomales et autophagiques.

Il a été suggéré que le niveau d'expression de LRRK2 serait en partie régulé par son activité kinase, car une réduction du taux de LRRK2 a été observée *in vivo* chez des animaux transgéniques surexprimant un variant sans activité kinase de LRRK2 et l'inhibition prolongée son activité kinase entraîne une diminution de la quantité de protéine (Herzig et al. 2011; Lobbstaël et al. 2016; Perera et al. 2016; Skibinski et al. 2014). La diminution de l'activité kinase de LRRK2 diminue la phosphorylation de ses S910/935 (Vancaenenbroeck et al. 2014) et cela entraîne la perte de l'interaction de LRRK2 avec les protéines 14-3-3 (Dzamko et al., 2010). Il en résulterait une accumulation de LRRK2 dans des "pools" cytoplasmiques (alors qu'elle est normalement diffuse dans tout le cytoplasme) (Dzamko et al. 2010) et

l'augmentation de son ubiquitination et de sa dégradation (Zhao et al. 2015). Cependant, dans des cerveaux de patients atteints de la MP, il a été montré qu'il y avait une diminution de la phosphorylation des S910/S935 sans modification de la quantité totale de LRRK2 (dans la SNpc, mais aussi l'amygdale et le cortex frontal) (Dzamko et al. 2017), ce qui signifie que le mécanisme de régulation de l'expression de LRRK2 est probablement bien plus complexe.

## II. Fonctions physiologiques, substrats

L'étude des substrats de LRRK2 et de l'effet de son KO ou de ses mutations pathogènes ont permis de l'impliquer dans plusieurs processus cellulaires, notamment l'autophagie, les voies endolysosomales, le trafic des vésicules synaptiques et la dynamique du cytosquelette (Figure 21) (Parisiadou et Cai 2010; Roosen et Cookson 2016).

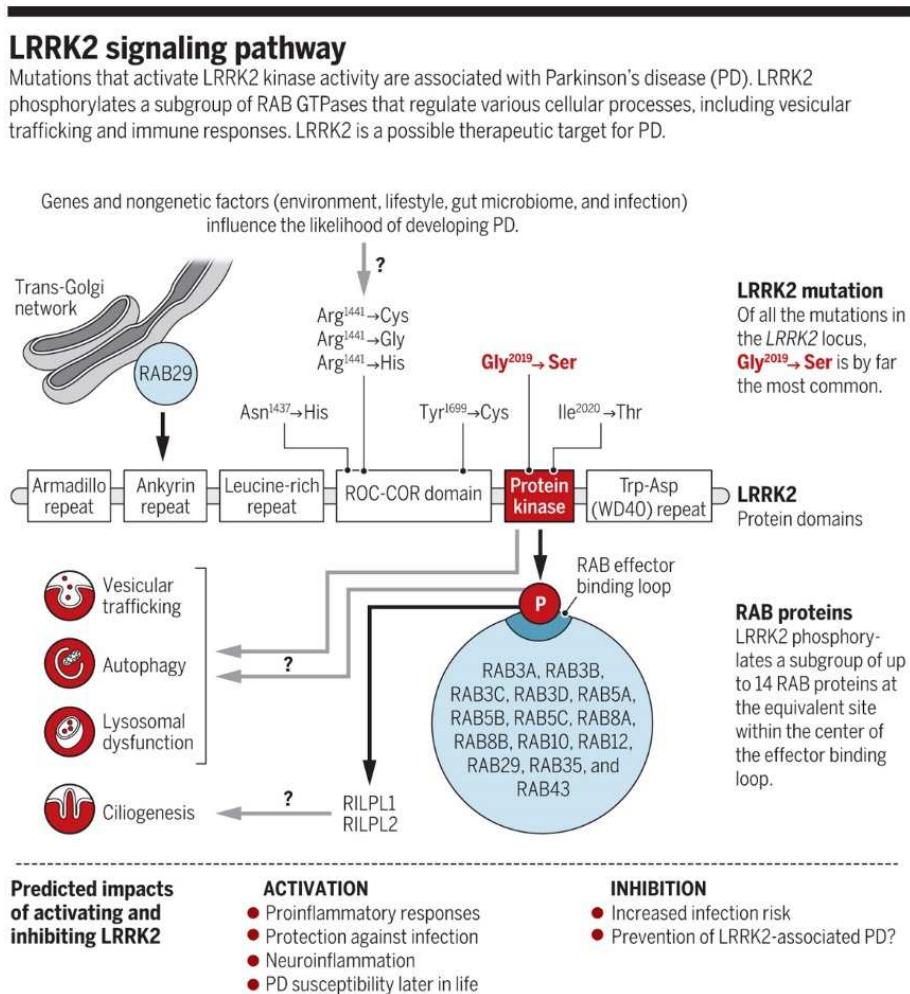


Figure 21. Voies de signalisations liées à LRRK2 (Alessi et Sammler 2018)



### **A. LRRK2 et dynamique du cytosquelette**

Il semblerait que LRRK2 régule la dynamique du cytosquelette en interagissant avec et/ou en phosphorylant plusieurs cibles associées à l'actine (PAK6, PKA, l'actine, ou encore les protéines ezrine/radixine/moesine (ERM)) ou aux microtubules (tubuline, tau). (Civiero et al. 2018). Cela suggère un rôle de LRRK2 dans la dynamique du cytosquelette, qui pourrait être perturbé par l'augmentation pathogène de son activité kinase. En effet, un effet avéré de LRRK2 G2019S est la diminution de la croissance des neurites (Civiero et al. 2018; Marrone et al. 2018), alors que la diminution de l'expression de LRRK2 (KD, pour *Knock Down*) via un shRNA augmente leur taille (MacLeod et al. 2006). Cet effet sur la croissance des neurites pourrait être lié à l'interaction de LRRK2 avec les protéines 14-3-3. En effet, la phosphorylation des protéines 14-3-3 $\gamma$  par la sérine/thréonine kinase PAK6 dans les neurones empêcherait la diminution de la taille des neurites induite par LRRK2 G2019S (Civiero et al. 2017). Cet effet bénéfique serait médié par le fait que la phosphorylation des protéines 14-3-3 $\gamma$  entraînerait la dissociation du complexe 14-3-3 $\gamma$ /LRRK2 et la déphosphorylation de LRRK2 à la S935 (Civiero et al. 2017).

### **B. LRRK2 et trafic vésiculaire**

Parmi les substrats proposés de LRRK2, il y a aussi 14 Rab GTPases (Rab3A/B/C/D, Rab5A/B/C, Rab8A/B, Rab10, Rab12, Rab29, Rab35 and Rab43) (Steger et al. 2016). Les Rab sont des protéines qui régulent le trafic membranaire, gérant la formation et le mouvement des vésicules, ainsi que leur arrimage et leur fusion avec les membranes (qui sont des procédés essentiels du processus d'autophagie et pour le bon fonctionnement du lysosome) (Alessi et Sammler 2018). Tous les mutants pathogènes de LRRK2 testés à ce jour augmentent la phosphorylation des Rab *in vivo* (Steger et al. 2016), ce qui suggère un rôle de LRRK2 dans le trafic des vésicules synaptiques. Cette hypothèse est confortée par le fait que, chez la drosophile et dans des neurones primaires, le KO de LRRK2 (Arranz et al. 2015; Matta et al. 2012) et sa surexpression (Matta et al. 2012) empêchent tous deux l'endocytose des vésicules synaptiques (Arranz et al. 2015; Matta et al. 2012; Shin et al. 2008). Cet effet serait bloqué par la co-expression de Rab5B (Shin et al. 2008). Cela va donc dans le sens d'une implication de LRRK2 dans la fonction synaptique via la régulation de l'endocytose des vésicules synaptiques.

LRRK2 phosphoryle également Rab10 sur sa T73, une protéine Rab qui a été impliquée dans le maintien du réticulum endoplasmique, le trafic vésiculaire et l'autophagie (Steger et al. 2016). La phosphorylation de Rab10 par LRRK2 inhibe sa fonction en empêchant sa liaison avec les facteurs inhibiteurs de la dissociation du GDP (*Rab GDP-dissociation inhibitor factors*) nécessaires à son acheminement à la membrane plasmique et son recyclage (Di Maio et al. 2018). La phosphorylation de Rab10 est proportionnelle à l'activité kinase de LRRK2 (Fan et al. 2018), et il est donc probable qu'une

augmentation toxique de cette activité kinase soit associée à une diminution de l'activité de Rab10 et de ses cibles (Di Maio et al. 2018). La phosphorylation de Rab10 est maintenant utilisée en biochimie pour estimer l'activité kinase de LRRK2. Un autre régulateur du trafic vésiculaire, VPS35, a été identifié comme étant un modulateur de l'activité kinase de LRRK2. La mutation pathogène D620N de VPS35, qui est impliquée dans les formes familiales de la MP, augmenterait la phosphorylation des protéines Rab par LRRK2 (Mir et al. 2018).

D'autre part, des études dans des cultures primaires de neurones corticaux ont montré que la surexpression de LRRK2 G2019S pouvait également augmenter l'exocytose, et que cet effet était bloqué par le traitement avec un inhibiteur de l'activité kinase de LRRK2 (Belluzzi et al. 2016; Pan et al. 2017). LRRK2 phosphorylerait aussi la synapsine, une protéine adaptatrice interagissant avec la protéine SNAP-25, ce qui diminuerait son interaction avec SNAP-25 et par conséquent l'exocytose des vésicules synaptiques (Yun et al. 2013).

Plus généralement, cela pourrait indiquer un rôle de LRRK2 dans la neurotransmission. En effet, des souris avec un KI de LRRK2 G2019S présenteraient une diminution liée à l'âge des taux de DA extracellulaire dans le ST (Yue et al. 2015), et LRRK2 G2019S augmenterait la transmission synaptique glutamatergique (Beccano-Kelly et al. 2014; Plowey et al. 2014). Les données existantes reliant LRRK2 à la neurotransmission sont synthétisées dans Volta and Melrose, 2017.

LRRK2 aurait donc un rôle dans la régulation du trafic vésiculaire, via une interaction fonctionnelle avec plusieurs de ses acteurs (Roosen et Cookson 2016).

### **C. LRRK2 et autophagie**

LRRK2 serait également impliquée dans les processus d'autophagie. En effet, Tong et collaborateurs ont retrouvé une accumulation dépendante de l'âge de granules de lipofuscine, une agrégation de l' $\alpha$ syn et une augmentation du marqueur d'autophagie LC3-II dans les reins de souris KO pour LRRK2 et ont conclu à un blocage de l'autophagie chez ces souris (Tong et al. 2010). Il a également été montré que l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 activait l'autophagie in vitro (Manzoni et al. 2013; Saez-Atienzar et al. 2014).

Eguchi et collaborateurs ont rapporté que dans des lignées cellulaires, l'induction d'un stress lysosomal par surcharge protéique entraînait le recrutement de LRRK2 aux lysosomes, et que Rab7L1 agissait comme un adaptateur facilitant la translocation de LRRK2. Le recrutement de LRRK2 permettrait alors la stabilisation de ses substrats Rab8 et Rab10 sur les lysosomes via leur phosphorylation, et la

régulation de l'homéostasie lysosomale (Eguchi et al. 2018). LRRK2 jouerait donc un rôle dans la régulation du système autophagie/lysosome.

#### **D. LRRK2 et immunité**

Des fonctions importantes de LRRK2 ont également été rapportées dans l'immunité (Dzamko et Halliday 2012; Herzig et al. 2011). En effet, LRRK2 serait fortement exprimée dans les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes B, les monocytes et les cellules dendritiques (Gardet et al. 2010). Dans des lignées cellulaires ou des macrophages issus de la moelle osseuse, l'activation des récepteurs de type Toll (TLR, pour *Toll-Like Receptors*) induirait très rapidement la phosphorylation de LRRK2 sur ses S910 et S935, deux sites importants pour l'interaction de LRRK2 avec les protéines 14-3-3 (Dzamko et al. 2012). Les TLR sont impliqués dans la réponse inflammatoire contre les agents pathogènes étrangers (Dzamko et Halliday 2012). Il a également été montré que LRRK2 était un facteur de risque majeur des maladies intestinales inflammatoires (Seol, Nam, et Son 2019) et augmentait la sensibilité aux infections à mycobactéries (Marcinek et al. 2013; Wang et al. 2015). Il est aussi possible que LRRK2 participe à la régulation de l'inflammation. En effet, les souris déficientes en LRRK2 ou traitées avec un inhibiteur de LRRK2 ont une moins bonne capacité à lutter contre l'infection par les salmonelles et à l'inverse les souris G2019S sont protégées contre l'infection, ce qui suggère que les mutations activant LRRK2 pourraient promouvoir des réponses inflammatoires qui seraient protectrices contre les infections (Alessi et Sammler 2018). Au niveau cérébral, l'expression de LRRK2 est assez faible en conditions physiologiques, mais elle pourrait être augmentée dans certaines conditions pathologiques, ce qui indique également un rôle dans la régulation de la neuroinflammation (Dzamko 2017). En effet, il a été rapporté que l'expression de LRRK2 était augmentée dans les cellules microgliales activées par du lipopolysaccharide (LPS) (Moehle et al. 2012). De plus, l'exposition de cultures primaires de microglie à du LPS induit une augmentation significative de l'ARNm codant pour la cytokine pro-inflammatoire IL1- $\beta$ , qui est moins importante dans les cellules KO pour LRRK2 (Russo et al. 2019).

*In vivo*, le KO de LRRK2 protège les rats contre la perte des neurones DA induite par l'injection de LPS dans la SNpc et réduit le recrutement des cellules myéloïdes (Daher et al. 2014). Dans des souris transgéniques exprimant LRRK2 G2019S, les cellules microgliales présenteraient une diminution de la taille de leurs prolongements et une augmentation de la réponse inflammatoire (Ho et al. 2018). Tous ces résultats suggèrent un rôle de LRRK2 dans la régulation de la réponse inflammatoire au niveau périphérique et central, bien que son rôle précis dans ces mécanismes ne soit pas connu.

### III. Pathologie

Six mutations pathogènes de LRRK2 sont actuellement connues. Parmi elles, la mutation G2019S, située dans la boucle d'activation du domaine kinase de LRRK2, est la plus fréquente. Elle est très étudiée car elle induit une augmentation (d'un facteur 2 ou 3) de l'activité kinase de LRRK2 (Anand et al. 2009; Greggio et al. 2006; MacLeod et al. 2006; West et al. 2005). La pathologie induite par les mutations de LRRK2 est restreinte au cerveau alors que LRRK2 s'exprime dans d'autres organes, et à des niveaux plus élevés, ce qui implique que le contexte cérébral doit être primordial dans la pathologie liée à LRRK2 (Li et al. 2007). Li et collaborateurs ont montré que la protéine LRRK2 extraite du cerveau de souris transgéniques BAC exprimant LRRK2 avait une activité kinase plus élevée que la protéine LRRK2 extraite des poumons de ces mêmes animaux, ce qui va dans le sens d'une activité de LRRK2 spécifique dans le cerveau (Li et al. 2007). Si la plupart des études s'accordent sur l'hypothèse d'un gain de fonction toxique associé à l'augmentation de l'activité de LRRK2, il est intéressant de noter qu'il a également été suggéré que la toxicité de LRRK2 pourrait être due à une augmentation de son expression plutôt qu'à l'augmentation de son activité kinase (Skibinski et al. 2014).

Dans des neurones primaires de cortex de rongeurs et des cellules SH-SY5Y, la surexpression de LRRK2 G2019S par transfection induit une mort cellulaire significative, qui n'est pas retrouvée avec LRRK2 WT (MacLeod et al. 2006; Smith, Pei, et al. 2005) et qui est inhibée par l'addition d'une mutation D1994N bloquant l'activité kinase de LRRK2 (Greggio et al. 2006; Skibinski et al. 2014; Smith et al. 2006), ce qui souligne l'importance de l'activité kinase de LRRK2 dans sa toxicité.

Dans un modèle de surexpression dans des HEK, ainsi qu'au niveau endogène dans le cerveau de souris, la protéine adaptatrice de mort FADD (*Fas-associated protein with death domain*) interagit fortement avec LRRK2. Cette interaction est augmentée par la mutation G2019S et diminuée par l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 (Ho et al. 2009). Cela suggère une participation de la voie extrinsèque dans la mort cellulaire apoptotique induite par les mutants de LRRK2. LRRK2 a aussi été liée à la voie intrinsèque de l'apoptose car elle serait impliquée dans la phosphorylation de Bcl-2 - diminuant son effet anti-apoptotique - (Su, Guo, et Qi 2015) et de p53 (Ho et al. 2015). Des taux élevés de p53 phosphorylée ont été retrouvés dans des iPS dérivés de patients G2019S (Ho et al. 2015). Ces données suggèrent que les mutants de LRRK2 pourraient induire une mort cellulaire par apoptose.

Cependant, *in vivo*, peu de papiers rapportent une neurodégénérescence induite par la surexpression de LRRK2 G2019S. La plupart des modèles transgéniques exprimant LRRK2 ne présentent pas de perte drastique des neurones DA de la SN, bien qu'ils présentent une altération de la transmission dopaminergique (Martin et al. 2014). En revanche, dans certaines études, la surexpression

de LRRK2 G2019S dans le striatum de rongeurs, via des vecteurs viraux permettant son transport rétrograde vers la SNpc, entraîne une perte progressive des neurones TH+ dans cette région, qui est bloquée par une inhibition pharmacologique de l'activité kinase de LRRK2 (Dusonchet et al. 2011; Lee et al. 2010). La surexpression du fragment C-ter de LRRK2 (comprenant les domaines ROC, COR, KIN et WD40) spécifiquement dans la SNpc de rats via un vecteur viral induit également une perte significative des neurones DA après 6 mois (Cresto et al. Sous presse). Le KO de LRRK2 ou de LRRK1 chez la souris n'entraîne pas de dégénérescence de la SN, mais il est possible que LRRK1 compense pour la perte en LRRK2 et inversement. En revanche, le double KO pour LRRK2 et LRRK1 entraîne une dégénérescence des neurones DA de la SN à partir de 14-15 mois, précédée par une forte augmentation des vacuoles autophagiques à 10 mois, ce qui suggère une implication de l'autophagie dans la dégénérescence observée ici (Giaime et al. 2017).

#### **IV. Inhibiteurs de LRRK2**

Comme dit précédemment, la mutation G2019S (qui augmente l'activité kinase de LRRK2) induit une pathologie qui est indiscernable sur le plan clinique des formes sporadiques de la MP, et cette mutation est également retrouvée dans des cas sporadiques de la MP. LRRK2 est aussi activée dans la SNpc de patients sporadiques (Di Maio et al. 2018) et semblerait capable de moduler la toxicité de l' $\alpha$ syn (voir chapitre IV ci-dessous). Tous ces éléments ont déclenché la recherche active d'inhibiteurs de l'activité kinase de LRRK2, qui pourraient alors être bénéfiques à la fois pour les patients avec des formes familiales mais également pour les patients sporadiques. L'idée d'utiliser des inhibiteurs de LRRK2 comme thérapeutique est apparue en même temps que les premiers articles s'intéressant au rôle de l'activité kinase de LRRK2 dans la MP (Greggio et al. 2006; West et al. 2005). Actuellement, plusieurs compagnies pharmaceutiques ont des inhibiteurs de LRRK2 en essai clinique, notamment DNL201 (de Denali) qui est en phase 1b, et pour lequel la phase 1a n'a pas révélé de problèmes particuliers chez les volontaires sains.

Les premières études cherchant à inhiber pharmacologiquement l'activité kinase de LRRK2 avaient identifié des inhibiteurs qui n'étaient pas très spécifiques (Covy et Giasson 2009; Lee et al. 2010). Elles ont cependant permis de confirmer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de LRRK2, car ces molécules protégeaient contre la toxicité de LRRK2 G2019S *in vitro* et *in vivo* (Lee et al. 2010). Le premier inhibiteur sélectif, LRRK2-IN-1, a ensuite été identifié, mais malheureusement il ne traverse pas la BHE ce qui limite son utilisation thérapeutique (Deng et al. 2011).

LRRK2 est très exprimée dans les poumons et les reins, ce qui en fait des sites potentiels d'effets indésirables. Et en effet, le KO de LRRK2 chez la souris est associé à deux effets indésirables majeurs : l'accumulation de lipides et d'éléments du sang dans les reins et l'accumulation de corps lamellaires dans les pneumocytes de type II, potentiellement dues à une altération des voies de dégradation. Cependant ces phénotypes ne semblent pas altérer la fonction rénale ou pulmonaire chez les animaux âgés (West 2017). Les modèles KO ne sont pas forcément représentatifs uniquement de l'effet de la perte de l'activité kinase de LRRK2 puisque LRRK2 a bien d'autres fonctions (Taymans et Greggio 2016). Cependant, le traitement de PNH par des inhibiteurs de LRRK2 capables de passer la BHE (GNE-7915 et GNE-0877) a confirmé la formation de corps lamellaires dans les pneumocytes de ces animaux, ce qui suggère que ce serait bien un effet secondaire lié au blocage de l'activité kinase de LRRK2 (Fuji et al. 2015).

Des études chez le rongeur utilisant chroniquement des inhibiteurs de 3<sup>ème</sup> génération plus sélectifs, comme le MLI-2 et le PFE-475, n'ont pas montré d'effets majeurs sur les poumons (en dehors d'un très léger élargissement des pneumocytes de type II) ni sur les reins (Fell et al. 2015; Henderson, Sengupta, et al. 2019). Aucune réduction d'expression la protéine LRRK2 n'a été observée après un traitement oral de 4 semaines avec du PFE-475, aussi bien dans le cerveau que dans les poumons et les reins (Daher et al. 2015). Chez la souris, le traitement par voie orale pendant 15 semaines avec du MLI-2 n'entraînerait pas non plus de diminution de l'expression de LRRK2 totale dans le cerveau, mais diminuerait significativement la quantité de LRRK2 dans les poumons et les reins, organes dans lesquels LRRK2 est plus fortement exprimée (Fell et al. 2015). Il est donc possible que l'effet des inhibiteurs de LRRK2 sur son niveau d'expression n'apparaissent qu'à la suite de traitements chroniques (Fell et al. 2015).

Comme LRRK2 semble également impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire, il est aussi possible que son inhibition augmente le risque infectieux chez les patients, ce qui constitue un autre effet indésirable possible à surveiller lors des essais cliniques (Alessi et Sammler 2018).

## **V. Conclusion**

LRRK2 est donc très étudiée depuis la découverte de ses mutations, qui représentent la cause génétique la plus fréquente de la MP. En particulier, la mutation G2019S induit une augmentation toxique de son activité kinase. On sait maintenant que LRRK2 est également impliquée dans les formes idiopathiques, ce qui a encore augmenté l'intérêt de l'étude de cette protéine dans la physiopathologie de la MP. Il a été suggéré que LRRK2 pourrait moduler la toxicité de l'αsyn, potentiellement via son activité kinase. C'est à cette interaction fonctionnelle que nous allons maintenant nous intéresser.

## Chapitre IV. Interaction entre LRRK2 et l'αsyn

LRRK2 et l'αsyn sont donc deux protéines très étudiées dans la MP. L'αsyn car elle est retrouvée dans les corps de Lewy, qui sont une caractéristique histologique de la MP, et LRRK2 car ses mutations sont la cause la plus fréquente des formes génétiques de la MP. Comme il a été dit précédemment, les patients présentant une mutation de *LRRK2* ont des symptômes quasiment indiscernables de ceux des patients sporadiques et la plupart présentent des CL. Cela suggère qu'il y aurait des mécanismes communs aux formes sporadiques et génétiques et pose la question de l'étude de la potentielle interaction entre LRRK2 et l'αsyn afin de mieux comprendre ces mécanismes cellulaires dysfonctionnels dans la MP.

L'ensemble des indices suggérant une interaction fonctionnelle entre l'αsyn et LRRK2, ainsi que ses mécanismes potentiels, ont fait l'objet d'une revue que nous avons publiée début 2019, et que vous trouverez à la fin de l'introduction (Cresto, Gardier et al, 2019). Cependant comme elle est longue, nous avons repris ci-dessous les principaux éléments de littérature qui relient l'αsyn et LRRK2, ce qui a également permis d'y ajouter quelques références récentes.

### I. Données de la littérature qui montrent une interaction entre LRRK2 et l'αsyn

#### A. Données chez l'Homme

Les GWAS ont permis d'identifier des variants de *SNCA* et de *LRRK2*, indépendamment des mutations pathogènes, comme étant parmi les facteurs de risque les plus importants dans la MP (Nalls et al. 2014; Satake et al. 2009; Simón-Sánchez et al. 2009). Botta-Orfila et collaborateurs ont retrouvé le polymorphisme rs356219 de *SNCA* chez 84 patients G2019S espagnols (Botta-Orfila et al. 2012). Ce polymorphisme mononucléotidique est connu pour réguler l'expression de *SNCA* dans les régions cérébrales touchées dans les formes sporadiques de la MP, le sang et le plasma. Dans cette étude, les porteurs de mutations de *LRRK2* ayant un ou deux allèles rs356219-G de *SNCA* présentaient une MP avec un début plus précoce que les patients homozygotes avec l'allèle rs356219-A de *SNCA* (Botta-Orfila et al. 2012). Une étude similaire a été menée chez des patients sporadiques, dans laquelle ce polymorphisme influençait aussi l'âge de début de la MP (Cardo et al. 2012). Ces données suggèrent un lien entre *SNCA* et *LRRK2*.

Il est donc possible qu'il existe des mécanismes physiopathologiques communs entre LRRK2 et l'αsyn. Comme LRRK2 est une protéine kinase, il est tentant de spéculer que LRRK2 pourrait

phosphoryler l'αsyn et qu'elles interagiraient donc directement. La localisation cellulaire de ces deux protéines est cependant différente, et LRRK2 est faiblement exprimée dans la SNpc, ce qui fait qu'une interaction physique directe entre les deux protéines est peu probable. De plus, si certains patients avec la mutation G2019S de LRRK2 présentent des CL et NL, ce n'est pas le cas de tous (Giasson et al. 2006; Kalia et al. 2015). Il est possible qu'en présence de cette mutation de LRRK2, les CL soient plus délétères et les cellules qui en contiennent ne survivraient pas jusqu'aux stades tardifs de la maladie. Il est aussi possible que, chez les patients G2019S sans CL, le déclenchement et la progression de la maladie soient indépendantes de l'αsyn. Malheureusement, il n'y a pas assez de données cliniques associées à la plupart des tissus collectés pour savoir si la progression de la maladie était différente chez les patients LRRK2 avec et sans CL.

Les données chez l'homme semblent donc indiquer une interaction potentielle entre l'αsyn et LRRK2 dans la physiopathologie de la MP. Cependant, l'αsyn est une protéine plutôt synaptique alors que LRRK2 se localise plutôt dans le soma des neurones du striatum, ce qui rend une interaction directe entre LRRK2 et l'αsyn peu probable.

### **B. Effet de LRRK2 sur la toxicité de l'αsyn**

La première grosse étude *in vivo* s'intéressant à l'interaction entre LRRK2 et l'αsyn a été publiée par Lin et collaborateurs en 2009. Cette équipe a utilisé des souris doubles transgéniques avec une expression inductible de l'αsyn A53T et de LRRK2 WT ou G2019S ou des souris doubles transgéniques exprimant l'αsyn A53T sur un fond LRRK2<sup>-/-</sup> afin d'étudier l'effet de LRRK2 sur la pathologie induite par l'αsyn. Individuellement, ni la surexpression ni la délétion de LRRK2 n'entraînaient d'anomalie neuropathologique chez les souris mutantes. Par contre, à 6 mois, les souris A53T/LRRK2 WT et les souris A53T/LRRK2 G2019S présentaient une plus forte perte des neurones du striatum dorsal que les souris A53T. Il semblerait qu'il y ait légèrement plus de perte neuronale chez les souris A53T/LRRK2 G2019S que chez les souris A53T/LRRK2 WT mais cette différence n'était pas significative. En revanche la co-expression de LRRK2 G2019S avec l'αsyn A53T induit significativement plus d'activation des astrocytes et de la microglie dans le striatum que LRRK2 WT, ce qui suggère une aggravation par LRRK2 de la toxicité de l'αsyn. Cela a été confirmé par l'observation que le nombre de neurones dans le striatum était significativement plus élevé chez les souris A53T/LRRK2<sup>-/-</sup> que chez les souris A53T/LRRK2<sup>+/+</sup> âgées de 12 mois. Cette étude souligne le potentiel lien entre LRRK2 et l'αsyn, avec un rôle de LRRK2 G2019S dans la potentialisation de la pathologie. Il est intéressant de noter que les auteurs ont observé une diminution significative de l'αsyn phosphorylée dans les homogénats de cerveaux de souris



A53T/LRRK2 G2019S par rapport aux souris A53T, ce qui laisse penser qu'il est peu probable que l' $\alpha$ syn soit un substrat direct de LRRK2 (Lin et al. 2009).

A la suite de cette étude, Herzig et collaborateurs ont utilisé des souris doubles transgéniques surexprimant l' $\alpha$ syn humaine (WT ou A53T) et LRRK2 humaine (WT ou G2019S) sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1. Ces souris A53T développent des altérations motrices et une perte de poids, bien qu'elles ne présentent pas de neurodégénérescence marquée, contrairement à celles employées par Lin et collaborateurs. Dans cette étude, la co-expression de LRRK2 n'entraînait pas d'aggravation de la pathologie induite par l' $\alpha$ syn (Herzig et al. 2012). De la même manière, l'équipe Dawson n'a pas retrouvé de modification de la pathologie liée à l' $\alpha$ syn chez des souris doubles transgéniques surexprimant l' $\alpha$ syn humaine A53T sur un fond KO pour LRRK2 ou avec une co-expression de LRRK2 G2019S humaine, bien que ces animaux présentaient une légère augmentation des inclusions phosphorylées d' $\alpha$ syn (Daher et al. 2012).

En revanche, lorsque cette même équipe a repris l'approche du modèle avec le promoteur CAMKII pour obtenir un fort taux d'expression de LRRK2 G2019S dans le cerveau antérieur de souris adultes, les animaux présentaient une augmentation significative de l'agrégation de l' $\alpha$ syn endogène, en particulier dans le cortex, qui n'était pas retrouvée chez les animaux exprimant une forme sans activité kinase de LRRK2 (G2019S/D1994A) (Xiong et al. 2017). Des résultats similaires ont été obtenus dans des souris transgéniques avec une surexpression sélective de LRRK2 G2019S dans la SNpc, induisant une dégénérescence des neurones DA et l'agrégation de l' $\alpha$ syn endogène (Xiong et al. 2018).

Les modèles de surexpression aiguë de l' $\alpha$ syn via des vecteurs viraux ou l'injection de fibres préformées vont également dans le sens d'un effet de LRRK2 sur la toxicité de l' $\alpha$ syn. Les rats transgéniques BAC exprimant LRRK2 G2019S ne présentent que de très faibles altérations motrices et aucune perte des neurones DA, même lorsqu'ils sont âgés de 12 mois (Walker et al. 2014). Cependant, l'injection d'AAV codant pour l' $\alpha$ syn humaine dans la SNpc de ces animaux induit une perte significative des neurones TH+ et Nissl+ qui est significativement plus prononcée en présence de LRRK2 G2019S que chez les rats WT, et qui est bloquée par le traitement par un inhibiteur de l'activité kinase de LRRK2 (Daher et al. 2015). La même équipe a rapporté un effet plus prononcé chez des rats LRRK2 KO qui semblent protégés contre la dégénérescence des neurones DA induites par la surexpression de l' $\alpha$ syn dans la SNpc (Daher et al. 2014). De même, l'injection de fibres d' $\alpha$ syn dans le ST induit une plus forte perte des neurones DA chez des souris BAC transgéniques exprimant LRRK2 G2019S que chez des souris WT (Bieri et al. 2019). L'exposition de cultures primaires d'astrocytes de souris transgéniques G2019S à de l' $\alpha$ syn recombinante induit également une mort cellulaire plus importante que dans les astrocytes de souris WT (Lee et al. 2019).

Cependant, un papier récemment publié va à l'encontre de ces observations. Cette équipe s'est intéressée à l'effet de l'inhibition de LRRK2 endogène dans un modèle de MP. Ce modèle passe par l'injection de fibres d' $\alpha$ syn dans le ST dorsal de souris, qui entraîne le développement d'inclusions positives pour la pS129  $\alpha$ syn qui se propagent jusqu'aux régions connectées sur le plan anatomique, dont la SN. Dans ce modèle, l'injection de fibres d' $\alpha$ syn induit une perte des neurones de la SN et des altérations motrices. Ils ont ainsi montré que le traitement de ces souris *per os* avec l'inhibiteur de l'activité kinase de LRRK2 MLI-2 ne modifiait pas la pathologie induite par les fibres d' $\alpha$ syn (Henderson, Sengupta, et al. 2019).

Les résultats *in vivo* concernant l'effet de l'expression de LRRK2 sur la pathologie induite par l' $\alpha$ syn sont donc quelque peu discordants, mais les modèles utilisés n'exprimaient pas toujours les transgènes dans des régions cérébrales pertinentes dans le contexte de la MP (Novello et al. 2018). En effet, si des taux significatifs de LRRK2 G2019S ont été détectés dans la SNpc des rats transgéniques BAC (Daher et al. 2015), les souris transgéniques surexprimant LRRK2 G2019S ne présentent pas (Daher et al. 2012; Herzig et al. 2012) ou peu (Lin et al. 2009) d'expression de LRRK2 humain dans la SN. Ce problème a été adressé par Novello et collaborateurs, qui ont utilisé des souris transgéniques exprimant LRRK2 G2019S à un niveau proche de celui de LRRK2 endogène chez les animaux sauvages, notamment avec une expression significative dans les neurones TH+ de la SNpc. Ils ont utilisé des AAV pour surexprimer l' $\alpha$ syn A53T humaine dans la SNpc de ces animaux et ont observé une augmentation de l' $\alpha$ syn pS129 dans la SN et le ST plus importante chez les animaux G2019S que chez les animaux WT, ainsi qu'une augmentation de la perte des neurones DA de la SNpc (Novello et al. 2018).

A la suite de la découverte de Lin et collaborateurs concernant l'effet de LRRK2 sur la toxicité de l' $\alpha$ syn, des études *in vitro* ont également été réalisées afin de s'intéresser aux mécanismes possibles de cette interaction fonctionnelle. Ainsi, il a été montré dans des cellules SH-SY5Y différenciées que, si l' $\alpha$ syn WT ou A53T n'induisait pas de toxicité seule, sa co-expression avec LRRK2 WT ou G2019S induisait une diminution significative de la viabilité cellulaire (Kondo, Obitsu, et Teshima 2011). Il a aussi été montré que l'expression de l' $\alpha$ syn était nécessaire à la toxicité de LRRK2 G2019S dans des cultures primaires de neurones de rongeurs ainsi que dans des iPS de patients G2019S (Skibinski et al. 2014). Dans ce papier, l'effet positif de la régulation de l' $\alpha$ syn était attribuable à des modifications du niveau d'expression de LRRK2, de manière similaire à ce qui a été montré avec l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 (Rideout 2017).

### **C. Effet de LRRK2 sur l'agrégation de l'αsyn**

Comme le taux endogène de phosphorylation de l'αsyn sur sa S129 est relativement faible, mais qu'il est augmenté dans la MP, ce marqueur est souvent utilisé pour suivre la pathologie liée à l'αsyn. Il a été montré que des souris transgéniques exprimant LRRK2 G2019S présentaient une augmentation significative des taux d'αsyn pS129 endogène dans le ST par rapport aux souris WT (Longo et al. 2017). D'autres études, dans des cultures primaires de neurones, ont montré que l'expression de LRRK2 G2019S augmentait la formation d'inclusions phosphorylées induites par des fibres d'αsyn par rapport à des neurones surexprimant LRRK2 WT, et à l'inverse que l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 dans les cultures G2019S réduisait significativement la formation de ces inclusions d'αsyn (Bieri et al. 2019; Froula et al. 2018; L. A. Volpicelli-Daley et al. 2016), ce qui semble indiquer un mécanisme dépendant de l'activité kinase de LRRK2. Cette augmentation de la phosphorylation de l'αsyn a également été retrouvée dans la SNpc de souris BAC transgéniques surexprimant LRRK2 G2019S après l'injection de fibres d'αsyn (Bieri et al. 2019). Il semblerait donc possible que l'activité kinase de LRRK2 module, probablement de manière indirecte, l'état de phosphorylation de l'αsyn, ce qui pourrait influencer sur la pathologie. Cependant, comme précisé précédemment, l'effet exact de la phosphorylation de l'αsyn à sa S129 n'est pas très bien compris, bien qu'il soit clair qu'elle est associée à des processus pathologiques.

Dans des cellules SH-SY5Y différenciées, la formation de vésicules d'αsyn n'a pas lieu lorsque les cellules expriment l'αsyn seule, par contre la co-expression de LRRK2 G2019S avec l'αsyn induit la formation d'agrégats et de vésicules positifs pour l'αsyn. La plupart des agrégats d'αsyn colocalisent avec le marqueur de la membrane mitochondriale externe TOM20 dans les cellules co-exprimant l'αsyn et LRRK2 G2019S mais pas avec LRRK2 WT (Kondo et al. 2011). Plus récemment, une étude dans des neurones primaires de cortex de souris transgéniques exprimant LRRK2 G2019S a montré que cette expression induisait l'accumulation de l'αsyn endogène sous une forme non solubilisable par des détergents, et que cet effet pouvait être bloqué par l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 (Schapansky et al. 2018). Ces résultats ont également été observés dans des cellules SH-SY5Y surexprimant LRRK2 G2019S ou D1994A et exposées à des fibres d'αsyn (Bae et al. 2018). Une autre étude a montré que la diminution de la quantité de LRRK2 dans le cerveau de souris (via l'utilisation d'oligonucléotides antisens) protégeait contre la toxicité induite par l'injection de fibres préformées d'αsyn dans le ST de ces animaux, avec une diminution de la perte neuronale dans la SNpc et des agrégats positifs pour l'αsyn pS129 (Zhao et al. 2017). Le traitement de souris transgéniques surexprimant l'αsyn avec un inhibiteur de l'activité kinase de LRRK2 permet également de diminuer l'agrégation de l'αsyn (Bae et al. 2018). De plus, Lin et collaborateurs ont observé une augmentation de l'accumulation somatique de l'αsyn dans les neurones de souris exprimant l'αsyn A53T et LRRK2 G2019S par rapport aux souris simple

transgénique A53T ainsi qu'une augmentation de l'αsyn triton-insoluble (Lin et al. 2009). Ces résultats vont dans le sens d'un effet de LRRK2 sur l'agrégation de l'αsyn et sur sa localisation cellulaire qui potentiellement participerait à moduler l'agrégation de l'αsyn.

#### **D. Effets de LRRK2 sur la propagation de l'αsyn**

Il est maintenant globalement accepté que l'αsyn peut se propager de cellules en cellules dans des modèles *in vitro*, en particulier ceux qui utilisent des systèmes de microfluidique. En 2011, Volpicelli-Daley et collaborateurs ont observé cette transmission de cellules à cellules dans des neurones cultivés dans des chambres de microfluidique, exposés à des fibres préformées d'αsyn (Volpicelli-Daley et al. 2011). Beaucoup plus récemment, la propagation de l'αsyn a également été montrée dans des neurones corticaux humains cultivés dans des chambres de microfluidique (Gribaudo et al. 2019).

Kondo et collaborateurs ont étudié la transmission de l'αsyn par exocytose dans le milieu de culture. Ils ont ainsi montré qu'il était possible de retrouver de l'αsyn dans des cellules SH-SY5Y différenciées n'exprimant pas l'αsyn, en cultivant celles-ci dans du milieu conditionné d'autres cellules qui elles expriment l'αsyn, et que ce phénomène était augmenté lorsque les cellules co-expriment LRRK2 G2019S (Kondo et al. 2011). Cela suggère que LRRK2 G2019S augmenterait la libération d'αsyn dans le milieu de culture. Cependant, ils n'ont pas observé d'effet de LRRK2 G2019S sur la phosphorylation de l'αsyn (Kondo et al. 2011). L'étude récente citée précédemment (voir Chapitre II, partie C-2) qui a cartographié la pathologie induite par l'injection de fibres préformées d'αsyn dans le striatum dorsal de souris sauvages, a également étudié la pathologie induite par les fibres chez des animaux transgéniques surexprimant LRRK2 G2019S (Henderson, Cornblath, et al. 2019). Ils ont ainsi pu montrer que les souris G2019S présentaient une pathologie accrue dans certaines régions (notamment la SN) et diminuée dans d'autres par rapport aux souris non transgéniques, ce qui pourrait expliquer la disparité des résultats concernant l'effet de LRRK2 sur la toxicité de l'αsyn (Henderson, Cornblath, et al. 2019).

L'ensemble de ces études, malgré quelques discordances, suggère donc l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'αsyn et LRRK2. Les résultats de ces différentes études *in vivo* et *in vitro* sont synthétisés dans les tableaux 2 et 3, respectivement.

Tableau 2. Etudes *in vivo* de l'interaction entre l'asyn et LRRK2 et leurs principaux résultats. Tg = transgénique.

Ref	Modèle	Paramètres étudiés	Effet de LRRK2 sur la pathologie asyn	Conclusion	Effet de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn	Effet de l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn	
Lin et al, 2009	Souris double tg asyn A53T/LRRK2 WT ou G2019S - promoteur CAMKII	1&6 mois, perte neuronale dans le ST dorsal	Souris A53T/WT et A53T/GS > souris A53T	LRRK2 ↗ pathologie induite par asyn A53T	↗		
		1 mois, nombre de cellules GFAP+ dans le ST	Souris A53T/WT et A53T/GS > souris A53T				
		1 mois, neurones avec accumulation somatique asyn	Souris A53T/GS > souris A53T				
		1 mois, quantification par WB de l'asyn dans la fraction triton-insoluble	Souris A53T/GS > souris A53T				
		1 mois, quantification par WB de la pS129 asyn dans la fraction triton-soluble	Souris A53T/GS < souris A53T				
		1 mois, golgi fragmenté	Souris A53T/WT et A53T/GS > souris A53T				
		1 mois, fréquence des mitochondries avec un aspect anormal	Souris A53T/GS > souris A53T				
		1 mois, nombre de neurones MitoSox+ dans le ST	Souris A53T/GS > souris A53T				
	Souris double tg asyn A53T/LRRK2 -/- - promoteur CAMKII	12 mois, perte neuronale dans le ST dorsal	Souris A53T/LRRK2 -/- < souris A53T	KO de LRRK2 ↘ pathologie induite par asyn A53T	↗		
		12 mois, nombre de cellules GFAP+ dans le ST	Souris A53T/LRRK2 -/- < souris A53T				
		1 mois, neurones avec accumulation somatique asyn	Souris AR3T/LRRK2 -/- << souris A53T				
		12 mois, ratio entre espèces de haut poids moléculaire d'asyn et l'asyn monomérique	Souris AR3T/LRRK2 -/- < souris A53T				
	Daher et al, 2012	Souris double tg asyn A53T/LRRK2 G2019S - promoteur PrP	Survie des animaux	Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T	Pas d'effet de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn	=	
			13-14 mois, accumulation asyn pS129 dans la SNpc	Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T			
13-14 mois, accumulation asyn pS129 dans la formation réticulée			Souris A53T/LRRK2 G2019S > souris A53T				
13-14 mois, activation astrocytaire dans la SNpc			Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T				
13, 14 mois, nombre de neurones TH+ et Nissl+ dans la SNpc			Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T				
6 mois, déficits moteurs			Souris A53T/LRRK2 KO = souris A53T	Pas d'effet du KO de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn			
Survie des animaux		Souris A53T/LRRK2 KO = souris A53T					
13-14 mois, accumulation asyn pS129 dans la SNpc		Souris A53T/LRRK2 KO = souris A53T					
13-14 mois, accumulation asyn pS129 dans la formation réticulée		Souris A53T/LRRK2 KO < souris A53T					
13-14 mois, activation astrocytaire dans la SNpc		Souris A53T/LRRK2 KO = souris A53T					
13, 14 mois, nombre de neurones TH+ et Nissl+ dans la SNpc		Souris A53T/LRRK2 KO = souris A53T					
Herzig et al, 2012		Souris double tg asyn WT ou A53T/LRRK2 WT ou G2019S - promoteur Thy1	6 mois, déficits moteurs	Souris A53T/LRRK2 WT = souris A53T Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T Souris asyn WT/LRRK2 G2019S = souris asyn WT	Pas d'effet de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn	=	
	Survie des animaux		Souris A53T/LRRK2 WT = souris A53T Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T Souris asyn WT/LRRK2 G2019S = souris asyn WT				
	6 mois, activation microgliale dans le tronc cérébral		Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T				
	6 mois, asyn et pS129 asyn solubles et insolubles		Souris A53T/LRRK2 G2019S = souris A53T				

Daher et al, 2014	Rats LRRK2 WT ou KO +/- injection AAV-asyN WT dans la SNpc	4 semaines PI, cellules TH+ et Nissl+ dans la SNpc	Rats asyn/LRRK2 KO > Rats asyn/LRRK2 WT	KO de LRRK2 protège contre la neurodégénérescence induite par l'asyN	↗	
		4 semaines PI, activation microgliale	Rats asyn/LRRK2 KO < Rats asyn/LRRK2 WT			
Daher et al, 2015	Rats WT ou BAC tg LRRK2 G2019S + AAV-asyN WT dans la SNpc	4 semaines PI, cellules TH+ et Nissl+ dans la SNpc	Rats asyn/LRRK2 G2019S < Rats asyn/WT	LRRK2 G2019S ↗ pathologie induite par asyn A53T	↗	
		4 semaines PI, fibres TH+ dans le ST	Rats asyn/LRRK2 G2019S < Rats asyn/WT			
		4 semaines PI, activation microgliale	Rats asyn/LRRK2 G2019S > Rats asyn/WT			
	Rats BAC tg LRRK2 G2019S + AAV-asyN WT dans la SNpc +/- inhibiteur de LRRK2 (PF-475)	4 semaines PI, cellules TH+ et Nissl+ dans la SNpc	Rats asyn/LRRK2 G2019S + PF-475 > rats asyn/LRRK2 G2019S + contrôle	Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ↘ pathologie induite par asyn		↘
		4 semaines PI, fibres TH+ dans le ST	Rats asyn/LRRK2 G2019S + PF-475 > rats asyn/LRRK2 G2019S + contrôle			
		4 semaines PI, activation microgliale	Rats asyn/LRRK2 G2019S + PF-475 < rats asyn/LRRK2 G2019S + contrôle			
Rats WT + AAV-asyN WT dans la SNpc +/- inhibiteur de LRRK2 (PF-475)	4 semaines PI, cellules TH+ et Nissl+ dans la SNpc	Rats asyn + PF-475 > rats asyn + contrôle	Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ↘ pathologie induite par asyn		↘	
	4 semaines PI, fibres TH+ dans le ST	Rats asyn + PF-475 > rats asyn + contrôle				
	4 semaines PI, activation microgliale	Rats asyn + PF-475 = rats asyn + contrôle				
Volpicelli-Daley et al, 2016	Rats WT ou BAC tg LRRK2 G2019S + fibres asyn injectées dans la SNpc	4 semaines PI, inclusions pS129+ dans la SNpc	Rats G2019S + fibres asyn > rats WT + fibres asyn	LRRK2 G2019S ↗ formation d'inclusions pS129+ + phosphorylation de l'asyN endogène	↗	
		4 semaines PI, cellules TH+ dans la SNpc	Rats G2019S + fibres asyn = rats WT + fibres asyn = rats WT sans fibres			
Longo et al, 2017	Souris KI LRRK2 G2019S	12 mois, IP de l'asyN dans le ST, quantification de la pS129 asyn/asyN	Souris LRRK2 G2019S > souris WT	LRRK2 G2019S ↗ phosphorylation de l'asyN endogène	↗	
Xiong et al, 2017	CAMKII/Tet inducible G2019S or G2019S/D1994A tg mice	22 mois, espèces de haut PM d'asyN non solubles dans le triton	Souris G2019S LRRK2 > souris G2019S/D1994A LRRK2 et souris WT (bulbe olfactif, cortex, striatum, hippocampe)	LRRK2 G2019S ↗ agrégation et phosphorylation de l'asyN endogène - effet kinase-dépendant	↗	↘
		22 mois, pS129 asyn non soluble dans le triton	Souris G2019S LRRK2 > souris G2019S/D1994A LRRK2 et souris WT (bulbe olfactif, cortex, hippocampe)			
Zhao et al, 2017	Souris WT + injection oligonucléotides antisens (ASO) pour faire un KD de LRRK2 + PFF	Aggrégats pS129+ dans le ST	Souris ASO + PFF < souris PFF	KD de LRRK2 ↘ agrégation de l'asyN et la perte de neurones DA	↗	
		Nombre neurones TH+ dans la SNpc	Souris ASO + PFF > souris PFF			
Bae et al, 2018	Souris tg asyn WT humaine - promoteur Thy1 +/- inhibiteur de LRRK2 pendant 4 semaines	Aggrégats d'asyN (neocortex, ST, corps caleux)	Souris tg + inhibiteur de LRRK2 < souris tg + véhicule	Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ↘ agrégation asyn		↘
Novello et al, 2018	Souris âgées de 12 mois non tg ou tg G2019S LRRK2 +/- AAV asyn A53T humaine dans SNpc	Nombre neurones TH+ dans la SNpc	Souris G2019S + asyn A53T < souris WT + asyn A53T < souris WT + GFP	LRRK2 G2019S ↗ pathologie induite par l'asyN A53T chez les souris âgées	↗	
		Signal pS129 + dans la SNpc	Souris G2019S + asyn A53T > souris WT + asyn A53T > souris WT + GFP			
		Signal pS129 + dans le ST	Souris G2019S + asyn A53T > souris WT + asyn A53T > souris WT + GFP			
		Aggrégats pS129+ résistant à la PK dans la SNpc	Souris G2019S + asyn A53T > souris WT + asyn A53T > souris WT + GFP			
		Aggrégats pS129+ résistant à la PK dans le ST	Souris G2019S + asyn A53T > souris WT + asyn A53T > souris WT + GFP			

Bieri et al, 2019	Souris non tg ou tg LRRK2 2019S + PFF dans le ST	6 mois PI, proportion neurones pS129+/TH+ dans la SNpc	Souris G2019S + PFF > souris non tg + PFF	LRRK2 G2019S $\nrightarrow$ pathologie induite par l'asyn	↗	
		6 mois PI, nombres de neurones TH+ dans la SNpc	Souris G2019S + PFF < souris non tg + PFF < souris non tg ou G2019S + véhicule			
		6 mois PI, cytokines pro-inflammatoires dans le ST (ARNm)	Souris G2019S + PFF > souris non tg + PFF > souris non tg ou G2019S + véhicule			
Henderson et al, 2019b	Souris âgées de 3-4 mois non tg + PFF dans le ST +/- inhibiteur de LRRK2 (MLi-2)	3 mois PI, aire pS129+ dans la SNpc, l'aire tegmentale ventrale, l'hippocampe, le cortex visuel	Souris + PFF + véhicule = souris + PFF + MLI-2	Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 endogène ne modifie pas la pathologie induite par les PFF		=
		3 mois PI, nombre de neurones TH+ dans la SNpc	Souris + PFF + véhicule = souris + PFF + MLI-2			
Henderson et al, 2019b	Souris non tg ou BAC G2019S LRRK2 âgées de 3 mois + PFF dans le ST dorsal	Cartographie de la pathologie pS129 asyn	Schéma global de la propagation similaire mais vitesse diminuée Souris G2019S + PFF $\neq$ souris non tg + PFF dans certaines régions	LRRK2 G2019S modifie la propagation de l'asyn	↗	

Tableau 3. Etudes *in vitro* de l'interaction entre l'asyn et LRRK2 et leurs principaux résultats. Tg = transgénique.

Ref	Modèle	Paramètres étudiés	Effet de LRRK2 sur la pathologie asyn	Conclusion	Effet de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn	Effet de l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 sur la pathologie induite par l'asyn
Kondo et al, 2011	SH-SY5Y différenciés, transfectés pour exprimer asyn +/- LRRK2 WT/G2019S	Transmission de l'asyn (ajout de milieu conditionné de cellules transfectées avec de l'asyn +/- LRRK2 G2019S sur des cellules NT)	Cellules asyn + LRRK2 G2019S > cellules asyn seule	LRRK2 ↗ pathologie asyn	↗	
		Localisation mitochondriale de l'asyn pS129	Cellules asyn + LRRK2 G2019S > cellules asyn + LRRK2 WT			
		Mort cellulaire	Cellules asyn + LRRK2 WT ou G2019S > cellules asyn seule			
Skibinski et al, 2014	Neurons primaires de cortex de souris avec un triple KO pour les synucléines, transfectés à 7 DIV pour exprimer LRRK2 WT ou G2019S  iPS de patients G2019S différenciés en neurones dopaminergiques	Risque cumulatif de mort cellulaire	Cellules asyn KO + LRRK2 G2019S < cellules WT + LRRK2 G2019S	Expression de l'asyn nécessaire à la toxicité de LRRK2 G2019S	↗	
		Expression de l'asyn endogène dans les neurones TH+	Cellules de patients G2019S > cellules contrôle			
		Risque cumulatif de mort cellulaire	Cellules de patients G2019S + shRNA asyn < cellules de patients G2019S + shRNA contrôle			
Maekawa et al, 2016	Microglie isolée de souris WT ou LRRK2 KO +/- asyn recombinante	Prise en charge et dégradation de l'asyn	Cellules LRRK2 KO > cellules WT	KO LRRK2 ↗ élimination microgliale de l'asyn	↗	
Volpicelli-Daley et al, 2016	Neurons primaires d'hippocampe de souris non tg ou tg LRRK2 WT/G2019S  Neurons primaires d'hippocampe de souris non tg ou tg LRRK2 WT/G2019S + fibres d'asyn  Neurons primaires d'hippocampe de souris non tg ou tg LRRK2 G2019S + fibres d'asyn +/- inhibiteur de LRRK2 (MLi-2)	Expression de l'asyn endogène (WB)	Cellules LRRK2 G2019S > cellules LRRK2 WT	LRRK2 G2019S ↗ formation d'inclusions pS129+	↗	
		Inclusions pS129+	Cellules LRRK2 G2019S + fibres > cellules non tg + fibres Cellules LRRK2 WT + fibres > cellules non tg + fibres			
		Inclusions pS129+	Cellules non tg + fibres + Mli-2 < cellules non tg + fibres + contrôle Cellules LRRK2 G2019S + fibres + Mli-2 < cellules LRRK2 G2019S + fibres + contrôle	Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ↘ formation d'inclusions pS129+		↘
Zhao et al, 2017	Neurons primaires d'hippocampe de souris + PFF à 7 DIV, incubation 18 jours +/- traitement par oligonucleotides antisens (ASO) anti-LRRK2	Aire occupée par le marquage pS129+	Cellules + PFF > cellules + PFF + ASO	KD de LRRK2 ↘ phosphorylation de l'asyn endogène	↗	
Henderson et al, 2018	Neurons primaires d'hippocampe de souris non tg + PFF +/- inhibiteur de LRRK2 (PF-475) - incubation 14 jours	pS129 asyn insoluble	Cellules + PFF + PF-475 = cellules + PFF + véhicule	Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 endogène n'altère pas phosphorylation asyn		=
		Aire occupée par le marquage pS129+	Cellules + PFF + PF-475 = cellules + PFF + véhicule			
	Neurons primaires d'hippocampe de souris non tg ou tg LRRK2 G2019S + PFF +/- inhibiteur de LRRK2 (PF-475) - incubation 14 jours	Nombre de neurones (NeuN)	Cellules G2019S + PFF + véhicule = cellules G2019S + PFF + PF-475 = cellules WT + PFF + véhicule = cellules WT + PBS + véhicule	LRRK2 G2019S ↗ phosphorylation asyn dans neurones d'hippocampe & Inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ↘ phosphorylation asyn	↗	↘
		Aire occupée par le marquage pS129+	Cellules G2019S + PFF > cellules WT + PFF Cellules G2019S + PFF + véhicule > cellules G2019S + PFF + PF-475			
Neurons primaires de mésencéphale de souris non tg ou tg LRRK2 G2019S + PFF +/- inhibiteur de LRRK2 (PF-475) - incubation 14 jours	Aire occupée par le marquage pS129+ dans neurones TH+	Cellules G2019S + PFF + vésicule = cellules G2019S + PFF + PF-475 + cellules ntg + PFF + véhicule = cellules ntg + PFF + PF-475	LRRK2 G2019S n'altère pas phosphorylation asyn dans neurones DA	=	=	



Schapansky et al, 2018	Neurones primaires de cortex de souris non tg ou KI LRRK2 G2019S - 10 DIV	asyn endogène dans la fraction insoluble	Cellules G2019S > cellules non tg	LRRK2 G2019S ↗ accumulation et libération asyn endogène - activité kinase-dépendant	↗	↘
		asyn libérée dans le milieu	Cellules G2019S > cellules non tg			
	Neurones primaires de cortex de souris non tg ou KI LRRK2 G2019S +/- inhibiteur de LRRK2 (CZC25146)	asyn endogène dans la fraction insoluble	Cellules G2019S + inh < cellules G2019S + véhicule			
		asyn libérée dans le milieu	Cellules G2019S + inh < cellules G2019S + véhicule			
Bieri et al, 2019	Neurones primaires de cortex de souris non tg ou LRRK2 2019S + PFF	Marquage pS129/NeuN	Cellules G2019S > cellules non tg	LRRK2 G2019S ↗ pathologie asyn sans altérer internalisation PFF & KO de LRRK2 ↘ pathologie et expression asyn sans altérer internalisation PFF	↗	
		Internalisation des PFF	Cellules G2019S = cellules corrigées = cellules LRRK2 KO			
	Neurones différenciés à partir d'IPS de patients G2019S ou correction isogénique ou LRRK2 KO + PFF	3 semaines incubations, marquage pS129+	Cellules G2019S > cellules corrigées > cellules LRRK2 KO			
		3 semaines incubations, pS129 asyn insoluble	Cellules G2019S > cellules corrigées > cellules LRRK2 KO			
	3 semaines incubations, expression asyn	Cellules LRRK2 KO < cellules G2019S et cellules corrigées				
Lee et al, 2019	Astrocytes primaires de souris LRRK2 G2019S ou non tg + asyn oligomérique - incubation 48h	Apoptose (TUNEL)	Astrocytes G2019S + asyn > cellules non tg + asyn	LRRK2 G2019S ↗ toxicité asyn	↗	
		Potentiel de membrane mitochondrial	Astrocytes G2019S + asyn < cellules non tg + asyn (pas de stats)			
		Superoxide mitochondrial (MitoSox)	Astrocytes G2019S + asyn > cellules non tg + asyn (pas de stats)			

## **II. Mécanismes possibles de l'interaction entre LRRK2 et l'αsyn - focus sur la mitochondrie**

Les dysfonctions cellulaires et la neurodégénérescence dans la MP passent potentiellement par plusieurs mécanismes distincts mais non exclusifs. Trois grands mécanismes cellulaires semblent particulièrement impactés par l'αsyn et LRRK2 : l'inflammation, l'autophagie et la mitochondrie. Tout cela étant expliqué en détails dans la revue, nous avons résumé les principales notions concernant l'αsyn, LRRK2 et la neuroinflammation et l'autophagie, pour nous concentrer par la suite plus particulièrement sur les mécanismes mitochondriaux de l'interaction entre l'αsyn et LRRK2.

### **A. La neuroinflammation**

La neuroinflammation est un phénomène retrouvé dans de nombreuses pathologies neurologiques, mais on ne sait pas si elle est une conséquence de la neurodégénérescence ou plutôt un acteur clé qui la favoriserait ou la ralentirait (revu dans Skaper et al., 2018). Notamment, elle a été montrée dans le tissu cérébral de patients parkinsoniens, avec une activation de la microglie et une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (Hunot et al. 1999; McGeer, Itagaki, et McGeer 1988; Mogi et al. 1994, 1996). De plus, les GWAS ont identifié des polymorphismes génétiques dans des loci liés à l'immunité, comme le locus *HLA*, dont les gènes codent notamment les protéines du complexe Majeur d'Histocompatibilité II (CMH II) (Hamza et al. 2010).

Plusieurs études dans des modèles animaux et des tissus post-mortem de patients supportent l'idée que la neuroinflammation modulerait la neurodégénérescence. Par exemple, dans les modèles animaux aigus de la MP induis par l'injection de MPTP ou de fibres préformées d'αsyn, des signes de neuroinflammation sont visibles dans la SNpc et précèdent la perte des neurones DA (Duffy et al. 2018; Liberatore et al. 1999), et le blocage des voies de signalisation liées à l'inflammation réduit la perte de neurones DA (Maatouk et al. 2018; Wu et al. 2002; Yun et al. 2018). Chez des patients avec une MP avancée qui ont été greffés avec des neurones DA embryonnaires, il a été montré qu'il y avait une forte neuroinflammation et une activation marquée de la microglie dans tous les greffons analysés, bien avant le développement de CL dans ces derniers (Olanow et al. 2019). Cela suggère un rôle majeur de ces phénomènes dans l'agrégation de l'αsyn.

Plusieurs études ont corrélé la présence d'agrégats d'αsyn avec l'activation de la microglie, l'expression du CMH-II, et la neuroinflammation. Des études post-mortem chez des patients atteints de la MP ont montré que la détection de la microglie exprimant le CMH-II était un aussi bon moyen de suivre l'évolution de la pathologie que la phosphorylation de l'αsyn, plus couramment utilisée (Imamura et al. 2003). En ce qui concerne LRRK2, elle est exprimée dans les neurones mais également dans certaines cellules de l'immunité, comme les cellules myéloïdes et dans une moindre mesure les lymphocytes T, ce qui suggère un rôle dans l'immunité innée (revu dans Dzamko, 2017). Les GWAS ont également impliqué des variants de *LRRK2* dans

des maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn (Barrett et al. 2008) et dans la susceptibilité aux infections à mycobactéries (Marcinek et al. 2013; Wang et al. 2015). Le rôle exact de LRRK2 dans la réponse inflammatoire n'a pas été caractérisé mais il a été montré que l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ou son KO atténuait la réponse proinflammatoire *in vitro* et *in vivo* (Kim et al. 2012; Ma et al. 2015; Puccini et al. 2015; Russo et al. 2015), notamment celle induite par l' $\alpha$ syn (Daher et al. 2015). A l'inverse, l'injection de fibres préformées d' $\alpha$ syn dans le ST de souris transgéniques G2019S induirait plus d'activation microgliale et une plus forte augmentation des cytokines pro-inflammatoires que chez les animaux WT (Bieri et al. 2019). D'autre part, l'exposition de cultures primaires de microglie à des fibres préformées d' $\alpha$ syn induit une augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et de la superoxyde dismutase 2 (SOD2). La SOD2 joue un rôle majeur dans l'élimination des ROS mitochondriales et protège les cellules contre le stress oxydant. L'augmentation de l'expression d'IL-1 $\beta$  et de la SOD2 était moins forte dans des cellules microgliales présentant un KO de LRRK2 que dans les cellules issues de souris sauvages (Russo et al. 2019). Cela semble suggérer que LRRK2 augmenterait la sensibilité au stress induit par l' $\alpha$ syn.

Il semble donc probable que LRRK2 régule la réponse inflammatoire induite par l' $\alpha$ syn. On pourrait imaginer que LRRK2 G2019S pourrait augmenter la neuroinflammation induite par l' $\alpha$ syn, ce qui aggraverait les effets délétères induits par cette neuroinflammation, ou que ce soit l'activité de LRRK2 G2019S qui initie une réponse inflammatoire trop importante, déclenchant un cercle vicieux aggravé par l'agrégation de l' $\alpha$ syn.

## **B. L'autophagie**

Une des caractéristiques anatomo-pathologiques de la MP étant la formation d'inclusions intracytoplasmiques et intraneuritiques, un intérêt particulier est porté à l'étude des voies de dégradation des protéines, notamment le système autophagie-lysosome et le système ubiquitine-protéasome. Dans les cerveaux de patients parkinsoniens, des éléments caractéristiques de l'autophagie ont été montrés par immunohistochimie (Anglade et al., 1997), ainsi qu'un défaut de l'autophagie (Dehay et al., 2010).

Le système ubiquitine-protéasome s'occupe principalement de la dégradation des protéines qui ont une durée de vie courte, typiquement via des chaînes de polyubiquitine, alors que l'autophagie est responsable de la dégradation des protéines qui ont une longue durée de vie, des gros agrégats, et des organites cytoplasmiques (Zhang et al. 2012). On distingue 3 types d'autophagie selon le type de substrat pris en charge et la manière dont il atteint la lumière lysosomale: l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA, *Chaperone-Mediated Autophagy*), la macroautophagie et la microautophagie (pour plus de détails sur ces différentes voies, voir Schneider and Cuervo, 2014).

L'effet de LRRK2 et de l' $\alpha$ syn séparément sur l'autophagie a été largement étudié dans le contexte de la MP.

L'αsyn contient un motif de reconnaissance pour la CMA, ce qui suggère sa dégradation par cette voie (Cuervo et al. 2004; Fred Dice 1990). Cela a été confirmé *in vitro* (Cuervo et al. 2004; Paxinou et al. 2001; Webb et al. 2003). En revanche il a été montré que l'αsyn A53T bloquait la CMA (Cuervo et al, 2004). De plus, la CMA diminue avec l'âge (Cuervo et Wong 2014) et l'αsyn devient plus stable avec l'âge et les mutations (Li et al. 2004), ce qui va dans le sens d'une diminution de la dégradation de l'αsyn induite par le vieillissement et/ou la mutation de l'αsyn.

En ce qui concerne LRRK2, une fraction de la protéine est localisée aux membranes, et plus précisément aux vacuoles d'autophagie, aux amphisomes, aux autolysosomes et aux lysosomes (Alegre-Abarrategui et al. 2009; Dodson et al. 2012; Higashi et al. 2009; Orenstein et al. 2013). LRRK2 pourrait également être impliquée dans la macroautophagie mais les résultats sont contradictoires. Certains groupes observent une régulation positive de l'autophagie par LRRK2 (Dodson et al. 2014; Saha et al. 2015; Schapansky et al. 2014; Tong et al. 2010), alors que d'autres montrent plutôt un effet négatif de LRRK2 sur l'autophagie (Alegre-Abarrategui et al. 2009; Manzoni et al. 2016). En ce qui concerne les mutations de LRRK2, une augmentation de l'induction de l'autophagie a été observée dans des fibroblastes de patients avec la mutation G2019S (Bravo-San Pedro et al. 2013). Il est possible que les différences entre ces études soient dues à des différences de conditions expérimentales, mais il n'y a pour l'instant pas de consensus concernant l'effet de LRRK2 sur l'autophagie.

LRRK2 contient également plusieurs motifs d'adressage à la CMA, ce qui suggère que cela pourrait être un mécanisme participant à sa dégradation. Une étude de Orenstein et collaborateurs a confirmé cela et également montré que LRRK2 G2019S bloquerait la CMA (Orenstein et al. 2013). Comme l'αsyn est également éliminée par CMA, il est possible que LRRK2 G2019S induise ou augmente l'accumulation d'αsyn anormale en inhibant sa dégradation. Il a en effet été montré dans des cultures d'astrocytes de patients G2019S que cette mutation de LRRK2 était liée à une augmentation de la quantité d'αsyn dans ces cellules et un défaut de l'autophagie. Cette accumulation d'αsyn était bloquée par le traitement par un activateur de la CMA (di Domenico et al. 2019:2). Récemment, il a aussi été montré que LRRK2 G2019S altérerait la prise en charge des autophagosomes et l'activité lysosomale en empêchant la formation des autolysosomes et entraînait une accumulation de l'αsyn endogène dans des inclusions intracellulaires. Ces effets néfastes de LRRK2 G2019S étaient bloqués par l'inhibition pharmacologique de son activité kinase (Obergasteiger et al. 2019). Ces données renforcent l'hypothèse que l'augmentation de l'activité de LRRK2 (qui a été aussi montée chez les patients idiopathiques (Di Maio et al. 2018) pourrait être impliquée dans l'accumulation anormale de l'αsyn dans la MP.

### **C. La mitochondrie**

Il est généralement accepté que les premières cellules eukaryotes, déficientes en énergie, ont été colonisées il y a plus d'un milliard d'années par une bactérie présentant un système d'utilisation de l'oxygène

bien plus efficace, la chaîne respiratoire, donnant naissance aux mitochondries (Rich 2003). Au cours de l'évolution, les mitochondries ont conservé leur propre génome, qui est constitué d'un ADN double brin circulaire de 16,5 kb, transmis de manière non mendélienne (Baughman et Mootha 2006). L'ADNmt code pour 13 protéines qui sont toutes des composants de la chaîne de transport des électrons, mais cela ne représente qu'une faible proportion de la totalité des protéines composant la chaîne respiratoire. En effet, environ 99% des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires et nécessitent des signaux d'adressage spécifiques pour entrer dans la mitochondrie depuis le cytosol (Pfanner, Warscheid, et Wiedemann 2019). Les fonctions principales assurées par la mitochondrie sont la production d'énergie via la chaîne respiratoire, la régulation de la mort cellulaire par apoptose, le métabolisme du  $\text{Ca}^{2+}$  et la production de ROS. La mitochondrie est d'ailleurs une source majeure de radicaux libres dans la cellule, mais elle joue aussi un rôle important dans la réponse au stress oxydant.

La mitochondrie est la principale source d'énergie de la cellule. Il a été estimé que 3 molécules d'ATP étaient formées pour 10 protons transférés, ce qui correspondrait à la production de 65 kg d'ATP par jour (Rich 2003). La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 4 complexes (I-IV) et d'une ATP synthase, tous enchâssés dans la membrane mitochondriale interne. Les électrons dérivés de l'oxydation de métabolites (NADH et FADH<sub>2</sub>) permettent à la chaîne respiratoire de générer un gradient électrochimique en pompant des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons est utilisé par l'ATP synthase pour la synthèse d'ATP (Pfanner et al. 2019).

La mitochondrie est un organite extrêmement étudié dans la MP depuis la description post-mortem d'un déficit du complexe I dans le ST (Mizuno et al. 1989) et la SNpc (Schapira et al. 1990) de patients. Les inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (comme la roténone ou le MPTP) peuvent également induire un syndrome parkinsonien chez les personnes exposées ainsi que chez le rongeur ou le PNH (Langston et Ballard 1983; Schapira 2008). Les mutations dans les gènes codant pour les protéines PARKIN, DJ-1 et PINK1 sont impliquées dans les formes autosomiques récessives de la MP, et ces protéines sont toutes impliquées dans le contrôle qualité mitochondrial, ce qui représente un lien supplémentaire entre la mitochondrie et la MP (revu dans Dawson et al., 2010).

Les effets sur la mitochondrie de l'asyn d'une part, et de LRRK2 de l'autre, ont été très étudiés. Chez les rongeurs, l'asyn endogène ou exogène (WT ou A53T) se localise en partie à la mitochondrie (Chinta et al. 2010; Li et al. 2007; Martin et al. 2006; Nakamura et al. 2008; Subramaniam et al. 2014; Zhang et al. 2008). Il est possible que l'asyn interagisse directement avec TOM20 (translocase de la membrane mitochondriale externe) et inhibe l'import de protéines dans la mitochondrie (Di Maio et al. 2016). Une interaction de la pS129-asyn (induite par l'exposition à des fibres préformées d'asyn) avec TOM20 a également été montrée dans des cultures primaires de neurones corticaux (Wang et al. 2019). De plus, une homologie partielle avec la séquence d'adressage à la mitochondrie a été trouvée dans la partie Nter de l'asyn. La liaison de l'asyn aux

membranes mitochondriales semble particulièrement élevée dans le ST, la SNpc et le cortex des cerveaux de patients, des régions particulièrement atteintes dans la MP (Devi et al. 2008). L'import de l' $\alpha$ syn dans la mitochondrie serait dépendant du pH (Cole et al. 2008), ainsi que du potentiel de membrane et du pool d'ATP (Devi et al. 2008). *In vitro*, environ 10% de LRRK2 est retrouvée dans la fraction protéique enrichie en mitochondries (West et al. 2005).

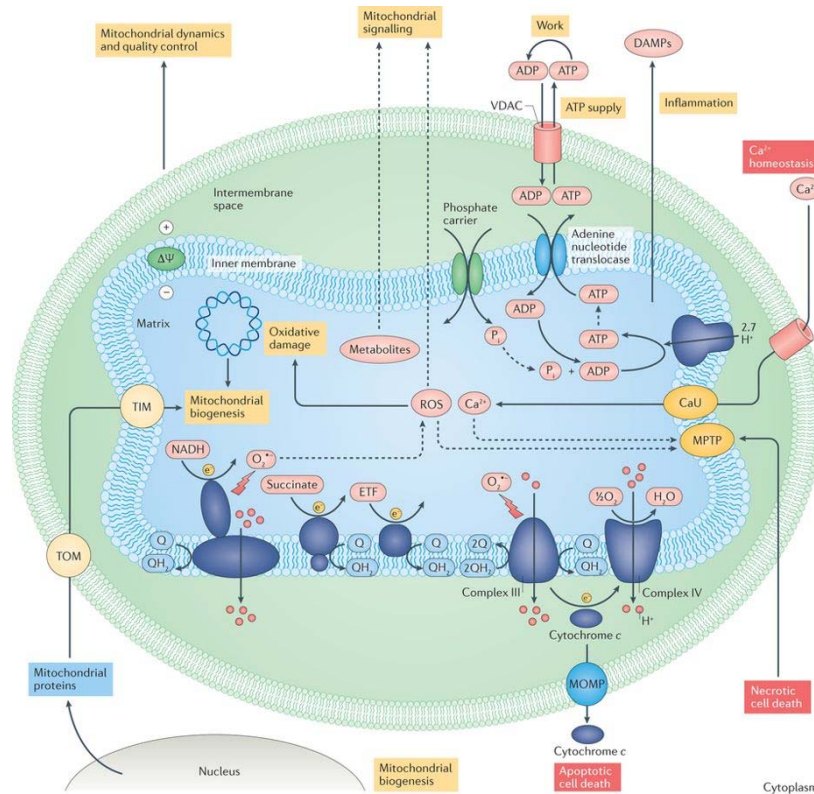
Des études dans des modèles (sur-)exprimant l' $\alpha$ syn ou LRRK2 muté ont montré une altération globale de la fonction mitochondriale avec une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, une diminution de la production d'ATP et une augmentation du stress oxydant (Butler et al. 2012; Erustes et al. 2017; Martin et al. 2006; Martinez et al. 2018; Melo et al. 2016; Mortiboys et al. 2010, 2015; Papkovskaia et al. 2012; Parihar et al. 2008; Sarafian et al. 2013; Y. C. Su et Qi 2013; Wang et al. 2012). Les souris KO pour l' $\alpha$ syn sont protégées contre la toxicité du MPTP, et à l'inverse les souris transgéniques surexprimant l' $\alpha$ syn humaine y seraient plus sensibles (Dauer et al. 2002; Klivenyi et al. 2006; Song et al. 2004). En revanche, les souris LRRK2 KO ne sont pas protégées contre la toxicité du MPTP (Andres-Mateos et al. 2009). Par contre, les souris surexprimant LRRK2 G2019S y sont plus sensibles (Karuppagounder et al. 2015). A la fois LRRK2 et l' $\alpha$ syn semblent donc jouer un rôle fonctionnel dans les altérations mitochondriales, du moins en présence de MPTP. De plus, l'étude par Lin et collaborateurs de 2009 s'intéressant à l'effet de la co-expression de LRRK2 et de l' $\alpha$ syn chez des souris double transgéniques a montré qu'il y avait une plus forte proportion de mitochondries anormales (matrice plus dense et crêtes élargies) dans le striatum des animaux co-exprimant LRRK2 G2019S et l' $\alpha$ syn A53T que chez les animaux simples transgéniques A53T (alors qu'aucune n'a été trouvée chez les animaux exprimant uniquement LRRK2 G2019S). De plus, il y avait chez ces animaux doubles transgéniques une augmentation significative du nombre de neurones striataux présentant une libération excessive de superoxyde dans la matrice mitochondriale (détectés grâce à la sonde fluorescente MitoSox®) (Lin et al. 2009).

### **C.1. Métabolisme énergétique**

La production d'énergie est la fonction principale de la mitochondrie. Le cycle de Krebs utilise l'acétyl-CoA généré par le pyruvate (via la glycolyse) ou par les acides gras (via la bêta oxydation) pour générer des électrons qui vont au NADH dans la matrice ou au pool de coenzyme Q au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Ce pool de coenzyme Q comprend une forme oxydée de l'ubiquinone (Q) et une forme réduite de l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>).

La NADH transfère ses électrons à travers le complexe I (CI) au pool de coenzyme Q, qui reçoit également des électrons de nombreuses autres sources. Depuis le pool de coenzyme Q, les électrons traversent le CIII jusqu'au cytochrome c, avant de réduire l'oxygène en eau au niveau du CIV. La différence de potentiel de réduction qui permet le mouvement des électrons à travers les CI, III et IV est utilisée pour pomper des protons

à travers la membrane mitochondriale interne, ce qui génère un potentiel de membrane d'environ 150-160mV et un gradient de pH, qui sont à leur tour utilisés pour la synthèse d'ATP par l'ATP-synthase. L'ATP produit est exporté depuis la matrice vers le cytosol en échange d'une molécule d'ADP par l'échangeur de nucléotides adénine (ANT, pour *adenine nucleotide exchanger*) (Figure 22) (Murphy et Hartley 2018).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 22. Le métabolisme énergétique mitochondrial** (Murphy et Hartley 2018).

Plusieurs études apportent des informations sur l'interaction de l' $\alpha$ syn avec la mitochondrie. Les souris  $\alpha$ syn KO présentent une diminution de la respiration mitochondriale et de l'activité des complexes I/III de la chaîne respiratoire (Ellis et al. 2005), et les souris transgéniques exprimant l' $\alpha$ syn A53T dans les neurones DA présentent une inhibition du complexe I liée à l'âge (Chinta et al. 2010). En 2008, Devi et collaborateurs ont identifié une forte diminution de l'activité du CI associée à l' $\alpha$ syn anormale, à la fois dans des neurones primaires corticaux de fœtus humains surexprimant l' $\alpha$ syn et dans des mitochondries isolées du ST et de la SN de patients parkinsoniens (Devi et al. 2008). Ces résultats ont également été reproduits dans d'autres modèles *in vitro* (Loeb et al. 2010; Reeve et al. 2015). L'exposition de mitochondries isolées de rats Wistar à différentes concentrations d' $\alpha$ syn humaine recombinante induit aussi une diminution dose-dépendante de l'activité du CI (Liu et al. 2009). De plus, il a été récemment montré que l'exposition de neurones primaires de cortex de souris à des fibres préformées d' $\alpha$ syn induisait une diminution significative de la respiration basale

par rapport à des neurones exposés à des monomères d'αsyn (Wang et al. 2019), ce qui suggère une toxicité mitochondriale différentielle des espèces d'αsyn.

En ce qui concerne l'effet de LRRK2 sur la respiration, les données sont moins claires. Dans des cellules HEK, l'expression de LRRK2 WT, et encore plus celle de LRRK2 G2019S diminuerait à la fois l'activité du CI et celle du CIV (Y. C. Su et Qi 2013). Des drosophiles transgéniques exprimant LRRK2 G2019S ou I2020T seraient plus sensibles à la toxicité induite par la roténone (qui est un inhibiteur du CI) alors que chez *C. elegans*, l'expression de LRRK2 WT mais pas G2019S protégerait contre la toxicité de la roténone (Saha et al. 2009).

## C.2. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries ne sont pas des organites isolés, mais elles forment un réseau dynamique qui fusionne et se divise en permanence. La fusion passe par des protéines comme les mitofusines (Mfn1 et Mfn2) au niveau de la membrane externe et la protéine OPA1 (*optic atrophy protein 1*) au niveau de la membrane interne, alors que la fission est contrôlée par des protéines comme DRP1 (*dynamin-related protein 1*) et Fis1 (Murphy et Hartley 2018). La fusion est modulée par la protéolyse de ses deux acteurs principaux, OPA1 et Mfn2. La dégradation de Mfn2 est dépendante de PINK1, et ce procédé est fortement lié à la perte du potentiel de membrane et à l'autophagie (Burté et al. 2015).

La morphologie du réseau de mitochondries est le reflet des besoins énergétiques de la cellule, et résulte d'un équilibre entre la fusion et la fission. Elle est intimement liée au contrôle qualité de la mitochondrie et la dégradation des mitochondries endommagées par mitophagie (Murphy et Hartley 2018). La protéine de fission DRP1 permet d'isoler les mitochondries endommagées du reste du réseau afin de permettre leur élimination sélective via les protéines Parkine et PINK1 (voir chapitre I, partie D-1-2) (Figure 23).

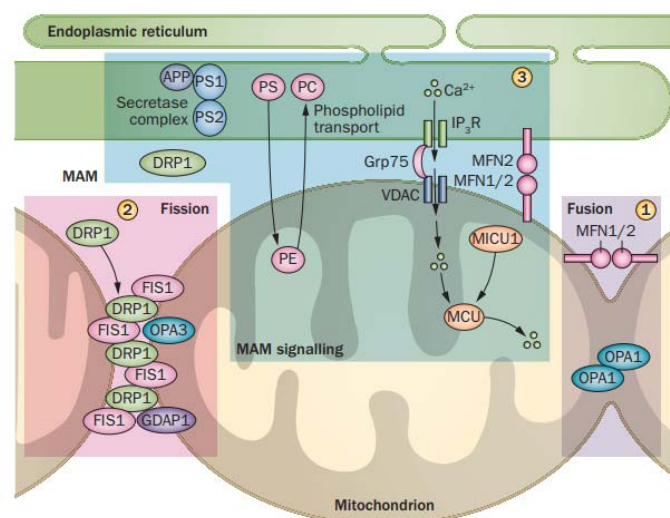


Figure 23. Dynamique de la mitochondrie (Burté et al. 2015).



Les souris transgéniques exprimant l' $\alpha$ syn A53T présentent des mitochondries dysmorphiques (Martin et al. 2006), une diminution de l'interconnectivité entre les mitochondries (Xie et Chung 2012) ainsi que des mitochondries fragmentées qui apparaissent avant la perte des neurones DA (Chen et al. 2015). Les souris doubles transgéniques KO pour l' $\alpha$ syn et la Parkine ont des altérations marquées de l'architecture mitochondriale, en particulier dans la SN et le cortex (Stichel et al. 2007). *In vitro*, le KD de l' $\alpha$ syn augmente le nombre de cellules avec des mitochondries allongées (Kamp et al. 2010) et la surexpression de l' $\alpha$ syn WT ou A53T induit la fragmentation des mitochondries (Butler et al. 2012; Devoto et al. 2017; Guardia-Laguarta et al. 2014; Martinez et al. 2018) qui précède la dysfonction mitochondriale et la mort cellulaire (Nakamura et al. 2011). Cet effet de l' $\alpha$ syn sur la fragmentation des mitochondries a également été montré dans des neurones DA dérivés de patients avec la mutation A53T (Ryan et al. 2018). *In vivo*, l'injection d'un AAV codant pour l' $\alpha$ syn A53T dans la SNpc de rat induit une diminution du nombre de mitochondries tubulaires, qui est empêchée par le traitement des animaux avec une molécule inhibant la division des mitochondries (mdivi-1) (Bido et al. 2017). De plus, la fragmentation mitochondriale induite par l' $\alpha$ syn nécessiterait une interaction directe avec la membrane mitochondriale externe dans des iPS surexprimant l' $\alpha$ syn (Devoto et al. 2017). Dans des cultures primaires de neurones de souris, les astrocytes internalisent les oligomères d' $\alpha$ syn, ce qui entraîne une fragmentation des mitochondries après 24h d'exposition (Lindström et al. 2017). En particulier, Grassi et collaborateurs ont récemment identifié une espèce d' $\alpha$ syn phosphorylée avec une conformation distincte (résultant de la dégradation incomplète de l' $\alpha$ syn fibrillaire) qui s'associerait avec la mitochondrie pour induire son dysfonctionnement (Grassi et al. 2018). Des diminutions significatives de l'expression de Mfn1/2 ont été observées dans les souris transgéniques A53T sans modification de DRP1 ni de OPA1 (Xie et Chung 2012), ce qui suggère un effet de l' $\alpha$ syn sur la fusion via une interaction avec la membrane mitochondriale externe. DRP1 est majoritairement localisée dans le cytoplasme, mais se relocalise à la mitochondrie sous l'influence d'un stimulus de fission. Dans les souris DRP1 KO, la surexpression de l' $\alpha$ syn WT induit toujours une fragmentation significative des mitochondries, bien qu'elle soit moins importante que chez les souris sauvages, suggérant que si l' $\alpha$ syn induit la fragmentation en partie via un effet sur DRP1, ce n'est pas le seul mécanisme impliqué (Nakamura et al. 2011). Ces données suggèrent donc que l'expression et l'agrégation de l' $\alpha$ syn diminueraient la fusion des mitochondries, plutôt que d'augmenter leur fission.

En ce qui concerne LRRK2, l'expression du mutant G2019S dans un modèle de drosophiles transgéniques a été associée à une altération de la morphologie des mitochondries (Mortiboys et al. 2015), ce qui suggère un effet de LRRK2 sur la dynamique mitochondriale. Il a en effet été suggéré que LRRK2 interagirait avec DRP1 pour augmenter sa translocation vers la mitochondrie, et que le blocage du recrutement de DRP1 à la mitochondrie inhiberait la fragmentation et la dysfonction mitochondriales induites par LRRK2 (Niu et al. 2012; Y. C. Su et Qi 2013; Wang et al. 2012). LRRK2 phosphoryle DRP1, ce qui induit la fragmentation des mitochondries (Y. C. Su et Qi 2013). Cet effet sur la fragmentation semble être dépendant de l'activité kinase

de LRRK2, ce qui est cohérent avec le fait que le mutant G2019S a un effet plus prononcé que la forme WT (Y. C. Su et Qi 2013; Wang et al. 2012). De cette manière, l'activité kinase de LRRK2 pourrait activer DRP1 et augmenter sa localisation mitochondriale, ce qui ferait pencher la balance en faveur de la fission mitochondriale. De plus, LRRK2 (mais pas son mutant sans activité kinase) augmente la production de ROS, ce qui est connu pour augmenter la fission des mitochondries (Niu et al. 2012). Récemment, il a également été montré que la mitophagie était diminuée dans des fibroblastes de patients avec la mutation G2019S de LRRK2 (Wauters et al. 2019), et que cet effet était dépendant de son activité kinase (Bonello et al. 2019).

Mais les résultats concernant l'effet de LRRK2 sur ces processus de fusion/fission ne sont pas convergents. Dans une étude *in vitro* par Saez-Atienzar et collaborateurs, c'est l'inhibition pharmacologique de LRRK2 qui mène à une augmentation de la fission (Saez-Atienzar et al. 2014). Il a également été montré que LRRK2 pouvait interférer avec le recrutement de DRP1 à la membrane mitochondriale externe et que cet effet était aboli par l'inhibition de son activité kinase (Bonello et al. 2019). Deux autres études montrent également des effets opposés de LRRK2 dans des fibroblastes issus de patients portant la mutation G2019S de LRRK2: l'une rapporte une augmentation de la fragmentation et donc un déséquilibre en faveur de la fission (Niu et al. 2012), alors que l'autre rapporte une augmentation de l'élongation et de l'interconnectivité des mitochondries, ce qui irait plutôt dans le sens d'un déséquilibre en faveur de la fusion (Mortiboys et al. 2010).

L'ensemble de ces études semble suggérer que LRRK2 et l' $\alpha$ syn pourraient avoir un effet direct sur la chaîne respiratoire, entraînant le dysfonctionnement de ces organites et une altération de la production d'énergie. Cependant, la seconde hypothèse, qui relie LRRK2 et l' $\alpha$ syn à une altération de l'équilibre entre les mécanismes de fusion et de fission semble aussi prometteuse. Toutes les données montrant un effet de l' $\alpha$ syn et de LRRK2 sur la toxicité des inhibiteurs du CI indiquent un effet potentiel de ces protéines sur la chaîne respiratoire mitochondriale, plus précisément sur l'activité du CI. Ces défauts du CI peuvent également induire un stress oxydant, une diminution de la production d'ATP et de la respiration (Devi et al. 2008; Loeb et al. 2010; Reeve et al. 2015). Tous ces événements induisant le dysfonctionnement des mitochondries pourraient donc être une explication pertinente pour les déficits mitochondriaux induits par LRRK2 et l' $\alpha$ syn. Comme l'homéostasie de la mitochondrie est finement régulée, avec un équilibre précis entre fission (notamment via les protéines DRP1 et Fis1) et fusion (impliquant les protéines OPA1 et Mfn1/2), la fragmentation des mitochondries peut refléter soit une augmentation de la fission soit une diminution de la fusion. Au final, ces données suggèrent que LRRK2 et l' $\alpha$ syn pourraient avoir un effet commun sur deux aspects majeurs de l'homéostasie mitochondriale : la production d'énergie et la dynamique de la mitochondrie. Cependant, il existe une relation étroite entre la structure et la fonction énergétique du réseau mitochondrial, et l'altération d'un de ces aspects a des répercussions sur l'autre. Il est donc difficile de savoir lequel est la cause et lequel est la conséquence. Pour l'instant seule une étude s'intéressant à l'impact de LRRK2 sur la toxicité de l' $\alpha$ syn a

relevé des altérations mitochondriales (Lin et al. 2009). La porte est donc grande ouverte pour tenter de mieux comprendre l'effet conjoint de ces deux protéines sur la dysfonction mitochondriale dans la MP.

De plus en plus d'éléments indiquent donc l'existence d'une interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l' $\alpha$ syn. Dans plusieurs études, des effets plus importants ont été observés en diminuant l'expression ou l'activité de LRRK2 plutôt qu'en surexprimant LRRK2 muté, ce qui donne bon espoir que les traitements ciblant LRRK2 pourraient bénéficier à tous les patients (sporadiques ou non). Les mécanismes exacts sous-tendant l'interaction entre l' $\alpha$ syn et LRRK2 restent cependant inconnus. En conditions pathologiques, quand elles sont exprimées au sein d'une même cellule, il est probable que l' $\alpha$ syn et LRRK2 interagissent sur le plan fonctionnel au niveau de la mitochondrie, des voies de l'autophagie et du système endolysosomal. Elles pourraient également avoir un effet commun sur la neuroinflammation. En effet, bien que l'expression cérébrale de l' $\alpha$ syn soit restreinte aux neurones, LRRK2 est aussi exprimée dans le système immunitaire, en particulier les cellules connues pour répondre aux formes amyloïdes de l' $\alpha$ syn, et LRRK2 semble aggraver la réponse inflammatoire causée par l' $\alpha$ syn (Figure 24). A ce jour, aucun de ces mécanismes ne semble plus probable que l'autre. La MP est certainement multifactorielle, résultant de l'interaction complexe entre des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques, et elle est probablement la résultante de nombreux mécanismes interconnectés.

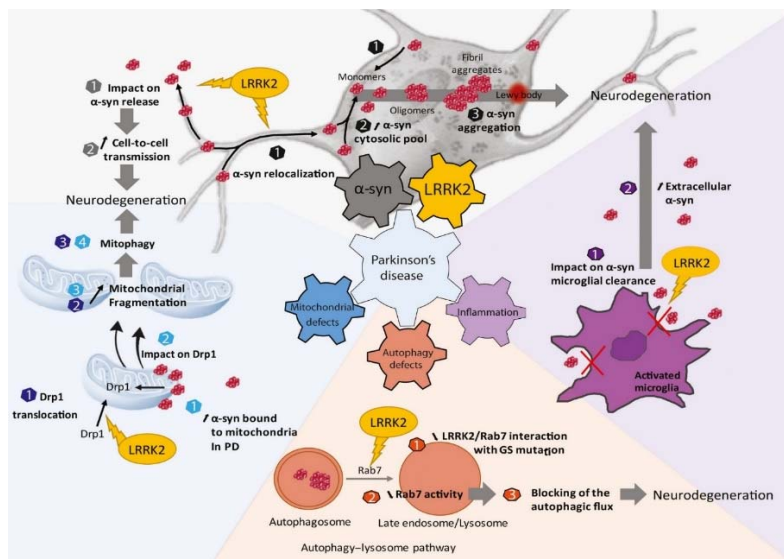


Figure 24. Différents mécanismes possibles de l'interaction fonctionnelle entre l' $\alpha$ syn et LRRK2 dans la MP (Cresto, Gardier, et al. 2019).

[Chapitre V. Revue - "The unlikely partnership between LRRK2 and  \$\alpha\$ -synuclein in Parkinson's disease", EJM, 2019](#)

# The unlikely partnership between LRRK2 and $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease

Noémie Cresto<sup>1</sup> | Camille Gardier<sup>1</sup> | Francesco Gubinelli<sup>1</sup> | Marie-Claude Gaillard<sup>1</sup> |  
Géraldine Liot<sup>1</sup> | Andrew B. West<sup>2</sup> | Emmanuel Brouillet<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Neurodegenerative Diseases Laboratory, UMR9199, CEA, CNRS, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, and MIRCen (Molecular Imaging Research Centre), Institut François Jacob, DRF, CEA, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup>Center for Neurodegeneration and Experimental Therapeutics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama

## Correspondence

Andrew B. West, Center for Neurodegeneration and Experimental Therapeutics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL.  
Email: abwest@uab.edu

and  
Emmanuel Brouillet, Neurodegenerative Diseases Laboratory, UMR9199, CEA, CNRS, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, and MIRCen (Molecular Imaging Research Centre), Institut François

## Abstract

Our understanding of the mechanisms underlying Parkinson's disease, the once archetypical nongenetic neurodegenerative disorder, has dramatically increased with the identification of  $\alpha$ -synuclein and LRRK2 pathogenic mutations. While  $\alpha$ -synuclein protein composes the aggregates that can spread through much of the brain in disease, LRRK2 encodes a multidomain dual-enzyme distinct from any other protein linked to neurodegeneration. In this review, we discuss emergent datasets from multiple model systems that suggest these unlikely partners do interact in important ways in

**Abbreviations:** AAV, Adeno-associated virus; ADPD, Autosomal-dominant Parkinson's disease; ALP, Autophagy-lysosome pathway; ANK, Ankyrin; APP, Amyloid precursor protein; ARM, Armadillo; Atg, Autophagy-related protein; ATP, Adenosine Triphosphate; BAC, Bacterial artificial chromosome; BAD, Bcl-2-associated death promoter; Bcl-2, B-cells lymphoma 2; CaMKII, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; CI – CIV, Complex I – Complex IV of mitochondrial respiratory chain; CMA, Chaperone-mediated autophagy; CNS, Central nervous system; COR, C-terminal of Roc; DA, Dopamine; DAT, Dopamine transporter; Drp1, Dynamid-related protein 1; ERK, Extracellular signal-regulated kinase; Fis1, Mitochondrial fission protein 1; GAD, G proteins activated by nucleotide-dependent dimerization; GDAP1, Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1; GLP1R, Glucagon-like peptide-1 receptor; GWAS, Genome-wide association; HEK, Human embryonic kidney (cell line); HSC70, Heath shock cognate protein; IBA1, Ionized calcium-binding adapter molecule 1; IBD, Inflammatory bowel disease; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 beta; IL-6, Interleukin 6; iNOS, Inducible nitrite oxide synthase; iPD, Idiopathic Parkinson's disease; iPS, Induced pluripotent stem cells; JNK, c-Jun N-terminal kinase; kD, kilo-dalton; KI, Knockin; KO, Knockout; LAMP2, Lysosome-associated membrane protein 2; LB, Lewy bodies; LC3-II, LC3-phosphatidylethanolamine conjugate; L-dopa, Levodopa; LN, Lewy neurites; LPS, Lipopolysaccharides; LRRK2, Leucine-rich repeat kinase 2; LRR, Leucine-rich repeats; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MHC-II, Major histocompatibility complex II; Mnf1 – Mnf2, Mitochondrial nucleoid factor 1 – 2; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; mRNA, Messenger RiboNucleic Acid; mTOR, Mammalian target of rapamycin; MyD88, Myeloid differentiation primary response 88; NFAT, Nuclear factor of activated T cells; NF- $\kappa$ B, Nuclear factor kappa B; NHPs, Nonhuman primates; NO, Nitrite oxide; OPA1, mitochondrial dynamin like GTPase; PARK8, Old name for LRRK2; PD, Parkinson's disease; PET, Positron emission tomography; PFFs, Preformed fibrils; PrP, Prion protein; pSer, phosphorylated Serine; Roc, Ras-of-complex; Ser, Serine; shRNA, Short hairpin RNA; SH-SY5Y, Homo sapiens bone marrow neuroblast cell line; siRNA, Small interfering RNA; SNCA, alpha synuclein (gene); SNC, Substantia nigra pars compacta; SNP, Single nucleotide polymorphism; SOD1, Superoxide dismutase 1; TDP43, TAR DNA-binding protein 43; Tg, Transgenic; TH, tyrosine hydroxylase; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor alpha; TOM20, Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20; tTa, Tetracycline transactivator; Tyr, Tyrosine; UPS, Ubiquitin-proteasome system; vMAT, Vesicle dopamine transporter; WD40, Beta-transducin repeat; WT, Wild type;  $\alpha$ -syn,  $\alpha$ -synuclein.

Noémie Cresto, Camille Gardier: Co-first authors

Andrew B. West, Emmanuel Brouillet: Co-last authors

Edited by Paul Bolam. Reviewed by Richard Wade-Martins and Frederic Manfredsson.

All peer review communications can be found with the online version of the article.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2018 The Authors. *European Journal of Neuroscience* published by Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd.

Jacob, DRF, CEA, Fontenay-aux-Roses, France.

Email: emmanuel.brouillet@cea.fr

#### Funding information

European Union Horizon 2020 Programme, Grant/Award Number: H2020-MSCA-ITN-2015; Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network, Grant/Award Number: 676408; “Fondation de France, Parkinson committee”, Grant/Award Number: AAP 2010, Engt 00016819 and AAP 2014, Engt 2014-0052580; NeurATRIS, “Investissement d’Avenir”, Grant/Award Number: ANR-11-INBS-0011; NIH, Grant/Award Number: R01 NS064934, U01 NS097028 and R33 NS097643

disease, both within cells that express both LRRK2 and  $\alpha$ -synuclein as well as through more indirect pathways that might involve neuroinflammation. Although the link between LRRK2 and disease can be understood in part through LRRK2 kinase activity (phosphotransferase activity),  $\alpha$ -synuclein toxicity is multilayered and plausibly interacts with LRRK2 kinase activity in several ways. We discuss common protein interactors like 14-3-3s that may regulate  $\alpha$ -synuclein and LRRK2 in disease. Finally, we examine cellular pathways and outcomes common to both mutant  $\alpha$ -synuclein expression and LRRK2 activity and points of intersection. Understanding the interplay between these two unlikely partners in disease may provide new therapeutic avenues for PD.

#### KEYWORDS

aggregation, autophagy, mitochondria, mitophagy, neurodegeneration, neuroinflammation, Parkinson, prion-like propagation

## 1 | INTRODUCTION TO LRRK2 AND A-SYN IN PD

Parkinson’s disease (PD) is a neurodegenerative disorder affecting approximately seven million people worldwide (Cacabelos, 2017). Early symptoms of disease often include REM sleep disorder, gastrointestinal disorders (e.g., constipation), and hyposmia. Later, characteristic movement-related symptoms often include shaking (resting tremor), rigidity, and slowness of movement (bradykinesia). The neuropathological hallmarks of PD are a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNc) and the presence of neuronal aggregates composed mainly of  $\alpha$ -synuclein protein ( $\alpha$ -syn; Lewy Bodies, LB) and dystrophic Lewy Neurites (LN) in some surviving neurons (Braak & Braak, 2000; Gibb, Scott, & Lees, 1991). Numerous theories exist for the causes of  $\alpha$ -syn aggregation and preferential sensitivity of DA neurons, but without treatments that intervene in these processes, pathogenic mechanisms underlying PD remain unclear. Currently, there is no treatment capable of slowing the disease progression and although several therapies such as dopaminergic treatment and deep brain stimulation provide temporary remittance of several movement-related symptoms, the progression of the disease and therefore the aggravation of the neurodegeneration cannot be stopped.

Parkinson’s disease is mainly a sporadic neurodegenerative disorder but a proportion of patients have demonstrated genetic origins. Rare mutations in the  $\alpha$ -synuclein (*SNCA*) and *Leucine-Rich Repeat Kinase 2* (*LRRK2*) genes can cause autosomal-dominant (AD) PD. Recently, genome-wide association studies have identified common genetic variants in both *SNCA* and *LRRK2* in susceptibility to sporadic PD, further supporting the importance of these two genes in the pathogenesis of PD (Nalls et al., 2014; Satake et al., 2009). The overlap between clinical phenotypes associated with mutations in *SNCA* or *LRRK2* suggests these two proteins/

genes concurrently play a role in sporadic and genetic PD. A number of questions are thus raised: Does  $\alpha$ -syn and LRRK2 interact synergistically in disease susceptibility? Following, does LRRK2 influence the occurrence and triggering of  $\alpha$ -syn pathology? Through which molecular and cellular mechanisms, do these two proteins interact in PD, and are they involved in both susceptibility as well as progression? Alternatively, does  $\alpha$ -syn play a more permissive role in mutant LRRK2 neurotoxicity?

Beyond improving our understanding of PD pathogenesis, clarifying the interplay between  $\alpha$ -syn and LRRK2 may help to determine whether LRRK2 could constitute a relevant therapeutic target to slow down PD progression in patients without rare LRRK2 mutations. Indeed, major research efforts have been conducted in the past decade to design and test novel LRRK2 inhibitors with hopes that they will benefit a large proportion of PD patients. Potentially supporting this notion, preliminary results in animal models of PD suggest that targeting LRRK2 could be beneficial in both familial and sporadic PD. Thus, the interaction between  $\alpha$ -syn and LRRK2 might be central not only in terms of pathogenesis but also in understanding how to best devise effective therapeutic strategies. Here, we briefly review both *in vitro* and *in vivo* studies in model systems that may shed light on the relationship between  $\alpha$ -syn and LRRK2 in PD.

## 2 | A-SYN AND PRION-LIKE PROPAGATION

In 1997, Polymeropoulos et al. identified the  $\alpha$ -syn A53T missense mutation as the first genetic lesion causative for an aggressive form of familial PD (Polymeropoulos et al., 1997).  $\alpha$ -Syn is a presynaptic protein highly abundant in the brain with suspected roles in vesicle trafficking, membrane

dynamics, and synaptic maintenance (reviewed in Bendor, Logan, & Edwards, 2013).  $\alpha$ -Syn has also been shown to localize to mitochondria and to be degraded in part via chaperone-mediated autophagy (detailed in the paragraphs below on mitochondria and autophagy). The clear majority of  $\alpha$ -syn studies focus on its dysfunction in PD pathology because of its capacity to aggregate and form LBs and LNs. Duplications, triplications, and rare mutations (A53T (Polymeropoulos et al., 1997); A30P (Krüger et al., 1998); E46K (Zarranz et al., 2004)) in the *SNCA* gene have been found in several families with dominantly inherited PD. They are associated with early-onset forms of PD with an amplification of the  $\alpha$ -syn aggregation process (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003). However, while it is generally accepted that aggregation of  $\alpha$ -syn leads to neurotoxicity, the underlying mechanisms are still debated. It is possible that  $\alpha$ -syn assemblies (aggregates, oligomers, lewy bodies) trigger toxic mechanisms through a gain of function (e.g., novel detrimental interaction with membranes or proteins) or a toxic loss of function of  $\alpha$ -syn as a result of the sequestration of  $\alpha$ -syn into aggregates. Indeed, multiple studies have shown a toxic effect of  $\alpha$ -syn knockout (Benskey et al., 2018; Cali, Ottolini, Negro, & Brini, 2012; Gorbatyuk et al., 2010; Tarasova et al., 2018) while others showed that  $\alpha$ -syn KO protected against MPTP-induced neurotoxicity (Dauer et al., 2002).  $\alpha$ -syn is a member of the synuclein protein family together with  $\beta$  and  $\gamma$ -synuclein in mammals. The  $\alpha$ -syn protein is composed of three regions: the first one is an amphipathic region (N-term: residues 1–60) containing apolipoprotein lipid-binding motifs and where PD mutations reside. Second,  $\alpha$ -syn contains a “non $\beta$  amyloid” component region (NAC region: residues 61–95) which gives it its potential to form  $\beta$ -sheets inherent to protein fibrils (aggregation). The last one is a C-terminal region (residues 96–140) that harbors important posttranslational modifications of  $\alpha$ -syn including phospho-Ser129. Three posttranslational modifications were identified and validated in vivo with phosphorylated residues detected on Ser87, Ser129, and Tyr125. In particular, postmortem biochemical and immunohistological studies showed that in PD brains  $\alpha$ -syn is highly phosphorylated on Ser129 in inclusions. This phosphorylation is also found in pre-LB stages suggesting that it is strongly associated to disease progression (Saito et al., 2003). The pharmacological modulation of this phosphorylation may be a relevant strategy for slowing PD progression, although several studies show  $\alpha$ -syn-related toxicity is enhanced when the Ser129 residue is mutated to an unphosphorylatable alanine residue (Da Silveira et al., 2009; Gorbatyuk et al., 2008; Khodr, Pedapati, Han, & Bohn, 2012). Some kinase interactors have been identified that can modulate Ser129 phosphorylation including polo-like kinases, casein kinases, and G protein-coupled receptor kinase (Inglis et al., 2009; Ishii et al., 2007; Pronin, Morris, Surguchov, & Benovic, 2000). LRRK2, a serine/threonine protein kinase,

has also been evaluated as a protein kinase for  $\alpha$ -syn. Results suggest that LRRK2 is unlikely to directly phosphorylate Ser129 (Herzig et al., 2012; Lin et al., 2009). The instrumental role of Ser129 phosphorylation on  $\alpha$ -syn is unclear and an increase of phospho-Ser129 might not be toxic per se. Studies using kinase interactors of  $\alpha$ -syn to produce hyperphosphorylation at Ser129 have shown opposite effects (accelerated neurodegeneration vs. mitigated toxicity) in the rat midbrain (Oueslati, Schneider, Aebischer, & Lashuel, 2013; Sato et al., 2011). Also, Buck and collaborators showed that phosphorylation of  $\alpha$ -syn at Ser129 was not enough to trigger neurodegeneration, further questioning the role of phospho-Ser129 in the pathogenesis of PD (Buck et al., 2015).

The pathological mechanisms underlying  $\alpha$ -syn-mediated degeneration of DA neurons have been linked to the very high concentrations of  $\alpha$ -syn inherent to A9 DA neurons (that can serve as substrates for  $\alpha$ -syn inclusions). SNc DA neurons also have relatively high metabolic demands and lowered oxidative capacity and long extremely branched axonal fibers that lack myelin (Braak & Del Tredici, 2004; Post, Lieberman, & Mosharov, 2018). Experimental evidence also indicates central roles for mitochondrial damage and associated vulnerabilities, and deregulation of the endolysosomal and autophagic pathways. Some evidence, particularly in vitro, clearly demonstrates that  $\alpha$ -syn inclusions can be transferred, through some substrate, from one cell to the next (Busquets, Espargaró, Estelrich, & Sabate, 2015; Domert et al., 2016; Kordower, Chu, Hauser, Freeman, & Olanow, 2008). Kordower and collaborators suggested cell–cell transmission of  $\alpha$ -syn in 2008. A postmortem observation of PD brains transplanted with fetal neurons in the striatum showed that, fourteen years after transplantation, the grafted nigral neurons presented LB-like inclusions that stained positively for  $\alpha$ -syn and ubiquitin and had a reduced expression of dopamine transporter. Alternatively, the transplanted cells could have intrinsically formed inclusions de novo in the environment of PD-affected nerve terminals in the striatum. Moreover, all healthy grafts of human midbrain transplants do not automatically show signs of  $\alpha$ -syn pathology (reviewed in Engelender & Isacson, 2017). Experimentally, cell-to-cell transmission in vivo generally involves overexpression of  $\alpha$ -syn and exposures to preformed fibrils of  $\alpha$ -syn, brain extracts from  $\alpha$ -syn transgenic (tg) mice, and total homogenates from postmortem PD patients. Many experimental results are supportive of the hypothesis of a prion-like propagation of  $\alpha$ -syn.  $\alpha$ -Syn-linked disease is different from prototypical prion disease, in that there is no evidence of disease transmissibility in PD and intrinsic susceptibilities inherent to some subpopulations of neurons appear to outweigh the ability of  $\alpha$ -syn to successfully transmit in a continuous way across circuits (Abdelmotilib et al., 2017; Desplats et al., 2009; Luk et al., 2012; Mougenot et al., 2012; Paumier et al., 2015; Peelaerts et al., 2015; Recasens & Dehay, 2014; Reviewed in Surmeier, Obeso, & Halliday, 2017b, 2017a).



However, even though there are many experimental studies supporting this prion-like hypothesis, it is important to note that there is a limited number of clinical evidence directly supporting it, and other experimental evidence goes against it. Indeed, Manfredsson and collaborators failed to show any significant spread of  $\alpha$ -syn after they inoculated PFFs directly into the colon of rats and NHPs (Manfredsson et al., 2018). Most of the studies supporting  $\alpha$ -syn spreading theory use overexpression models, or brain extracts from individuals presenting synucleinopathies, and among them, not all confirm this spreading hypothesis. This contrasted point of view is very well reviewed by Endelender and Isacson, who present a “Threshold theory for PD” (Engelender & Isacson, 2017).

### 3 | LRRK2 AND THE KINASE HYPOTHESIS OF LRRK2-LINKED PD

In the mid-1990s, several families were identified that transmit autosomal-dominant PD phenotypes identical to sporadic PD, a feature very uncommon for genetic forms of PD (Wszolek & Pfeiffer, 1992). In 2002, Funayama and collaborators performed a genome-wide linkage analysis showing linkage to a 13.6 cM interval in 12p11.2-q13.1, dubbed the PARK8 locus. While the haplotype was shared by all the patients, it was also present in some unaffected carriers, suggesting the disease penetration to be incomplete. The authors hypothesized other parameters could affect the development of the disease such as environmental factors or other genetic factors (Funayama et al., 2002).

Mutations in *LRRK2* are the most common genetic “cause” of both familial and sporadic PD, with causation understood as high-odds ratios (e.g., >20) for susceptibility to disease (Clark et al., 2006; Paisán-Ruíz et al., 2004; Ross et al., 2011; Trabzuni et al., 2013; Trinh et al., 2014; Zimprich et al., 2004). Kachergus and collaborators identified the G2019S mutation in 2005 (Kachergus et al., 2005), known as the most prevalent pathogenic mutation in *LRRK2* that accounts for 5%–6% of autosomal-dominant familial cases and 1%–2% of de novo generic PD cases in some Western populations (Gilks et al., 2005; Healy et al., 2008). The prevalence can be much higher depending on the population: a recent report suggested that as many as 70% of late-onset PD patients seen at a neurology clinic in Morocco were positive for G2019S (Bouhouche et al., 2017). However, in far-east Asian populations, the frequency of pathogenic *LRRK2* mutations is extremely low (Tan et al., 2005, 2007; Wu et al., 2012; Zabetian et al., 2009). True to the initial description of *LRRK2*-linked families, patients harboring the G2019S mutation are clinically indistinguishable from sporadic PD cases, including the presence of typical LBs in the majority of cases (Biskup & West, 2009; Yahalom et al., 2014). The mechanisms underlying *LRRK2*'s neurotoxicity remain unclear as it is a protein that does not itself form the proteinaceous

inclusions typical of genetically linked proteins in neurodegeneration (like tau, APP, TDP43, SOD1, etc.). Rather, the *LRRK2* gene encodes a large 2527 AA multidomain protein with pathogenic mutations clustered among the central tridomain region that forms the catalytic core (Cookson, 2010; Mata, Wedemeyer, Farrer, Taylor, & Gallo, 2006). *LRRK2* is part of the ROCO protein family identified first in single-celled organisms and contains the tandem Ras-of-complex proteins (Roc) GTPase and C-terminal of Roc (COR) domains. *LRRK2* may homodimerize through its COR domain and may function in a dimeric form as a GAD (G proteins activated by nucleotide-dependent dimerization) in which both ROC domains are brought close together and participate in the catalytic activity of their counterpart within the dimer (Civiero et al., 2012). In addition to its GTPase domain, *LRRK2* is composed of a kinase domain, with a characteristic activation loop (P-loop) with a DYG-APE motif altered to DYS-APE with the G2019S mutation. Other domains in *LRRK2* include multiple protein–protein interaction regions [ankyrin (ANK), armadillo (ARM), and leucine-rich repeats (LRR) and WD40]. The number and conservation of protein–protein interaction domains suggest *LRRK2* functions as a scaffolding protein contributing to the formation of multiprotein complexes that may function in trafficking and signaling.

In vitro evidence and limited in vivo evidence suggest pathogenic *LRRK2* mutations, like G2019S, enhance kinase activities associated with autophosphorylation and Rab-substrate phosphorylation (Alessi & Sammler, 2018; West et al., 2005, 2007), and *LRRK2*-linked neurotoxicity originates from this increased activity (Greggio et al., 2006; Lee et al., 2010; Smith et al., 2006; West et al., 2007). Based on these observations, pharmaceutical companies have developed compounds targeting the kinase activity of *LRRK2* in order to block the increased kinase activity associated with *LRRK2* mutations. So-called first-generation *LRRK2* kinase inhibitors like staurosporine, sunitinib, CZC 54252, TAE684, and *LRRK2*-IN-1 have a good potential to inhibit the kinase activity of *LRRK2* (Deng et al., 2011). However, they are not specific for *LRRK2* and inhibit other critical kinases, together with poor drug properties, making them difficult to use for modeling or functional studies. Second generation compounds included more selectivity and better in vivo potential, although the inhibition of *LRRK2* in the brain was limited (Choi et al., 2012; Estrada et al., 2014; Saez-Atienzar et al., 2014; reviewed in Taymans & Greggio, 2016; West, 2015, 2017).

Early studies demonstrated *LRRK2* is a highly phosphorylated protein in the N-terminal part between the ankyrin and the LRR domains (S910; S935; S955; S973; West et al., 2007). This cluster, more specifically Ser910 and 935, is responsible for 14-3-3 protein binding (Dzamko et al., 2010; Nichols et al., 2010). The 14-3-3 proteins are a highly conserved family of proteins found throughout the evolutionary scale and are implicated in many cellular functions, notably, they act to promote cell survival through inhibition of many known proapoptotic factors including the mitochondrial Bcl-2 family member BAD



and the transcription factor Forkhead (Yuan & Yankner, 2000). The 14-3-3 proteins bind to serine/threonine-phosphorylated residues, often functioning as direct regulators of the target proteins to which they bind (Loeffler, Klaver, Coffey, Aasly, & LeWitt, 2017). Seven isoforms are described in mammals. Studies show that 14-3-3 proteins are linked to PD pathology, as 14-3-3 also interacts with  $\alpha$ -syn (for more details, see the common interactors paragraph). LRRK2 binding of 14-3-3 leads to a uniform LRRK2 distribution throughout the cytoplasm and may inhibit LRRK2 kinase activity (Lavalley, Slone, Ding, West, & Yacoubian, 2016). Decreased 14-3-3 binding to LRRK2 induced by PD-associated mutations leads to a relocalization of LRRK2 in cytoplasmic pools (Nichols et al., 2010; Rudenko & Cookson, 2010). LRRK2 may also be subject to autophosphorylation on a cluster of threonines in the Rab-like ROC GTPase domain (T1343; T1368; T1403; T1404; T1410; T1452; T1491; T1503) and on two isolated serine and threonine residues in the LRR domain (S1292) and in the kinase domain (T2031; Kamikawaji, Ito, & Iwatsubo, 2009; Sheng et al., 2012; Webber et al., 2011). LRRK2 autophosphorylation appears to act as an enzymatic activator for both the GTPase and the kinase activity. In 2011, Webber and collaborators studied the effect of autophosphorylation on GTPase and on kinase activity in G2019S or in WT context. They showed that autophosphorylation on the T1503 that is localized in the GTPase domain alters both kinase and GTP-binding activity, concluding that autophosphorylation in the GTPase domain induces functional and conformational changes that enhance the dimerization and leads to upregulation of kinase activity. In 2012, Sheng and collaborators validated in vivo S1292 as a critical autophosphorylation site (Sheng et al., 2012). Familial PD mutations (N1437H, R1441G, R1441C, G2019S, and I2020T) all induced significant increases in phospho-S1292 levels compared to WT-LRRK2 in cellular models, and when the S1292 residue was mutated to a nonphosphorylatable alanine residue, the toxicity associated with LRRK2 kinase activity was ablated. Taken together, these data suggest that LRRK2 kinase activity links pathogenic mutations with neurotoxicity.

## 4 | RATIONALE FOR A MEANINGFUL INTERACTION BETWEEN LRRK2 AND $\alpha$ -SYNUCLEIN IN PD

### 4.1 | Evidence from humans

#### 4.1.1 | Clinical phenotypes

Several *LRRK2* mutations from a number of different families in different countries have been described and since they are relatively rare compared to sporadic (i.e., idiopathic or iPD) disease in most populations, comparisons that lack clinic bias are difficult to formulate. However, clinic bias tends to skew

genetic forms of disease phenotypically away from sporadic disease and with *LRRK2*, clinical characteristics of the symptomatic carriers are very similar to one another (Adams et al., 2005; Hasegawa et al., 2009; Huang et al., 2007; Hulihan et al., 2008; Khan et al., 2005; Lin et al., 2008; Nichols et al., 2005). Presently, there is no single clinical phenotype or scale that might predict a *LRRK2* mutation carrier from typical late-onset PD. Curiously, no major difference seems to exist between homozygous patients and the ones who are heterozygous, although the number of homozygous *LRRK2* mutation carriers yet described is very small, consistent with the frequency of the most common *LRRK2* mutation G2019S at less than 0.1% in the Caucasian population (where it is most frequent).

*LRRK2* mutations do not cause early-onset disease; the age of onset in susceptible carriers is relatively similar for iPD and *LRRK2* mutation carriers (~55–65 years old). Motor symptoms of *LRRK2* carriers include resting tremor, rigidity, akinesia, postural instability, and gait difficulty, which are reminiscent of those seen in iPD. Unilateral onset is often seen in *LRRK2* mutation carriers as it is in iPD. As expected, *LRRK2* carriers with PD are responsive to L-dopa treatment. Further, PET imaging studies of the dopaminergic system indicate alterations in symptomatic *LRRK2* carriers that are typical of iPD, especially the reduction in  $^{18}\text{F}$ -dopa accumulation in striatal DA projections, and reduced binding of  $^{11}\text{C}$ -tetrabenazine to the vesicle dopamine transporter (vMAT) and reduced binding of the  $^{11}\text{C}$ -methylphenidate to the dopamine transporter (DAT). The relative preservation of the DA projections in the caudate nucleus as compared to the putamen seen in iPD has been also observed in *LRRK2* mutation carriers (reviewed in Biskup & West, 2009).

Subtle differences have been described regarding the effect of *LRRK2* mutations on the timing and progression of certain symptoms in different populations of carriers. However, a prospective longitudinal follow-up of a cohort ( $n = 122$ ) of *LRRK2* variant carriers over more than five years indicated that the onset and symptoms were not different from iPD (Oosterveld et al., 2015). However, the progression of the disease after onset might be slightly accelerated in *LRRK2* carriers when compared to noncarriers (Oosterveld et al., 2015). Finally, some studies highlighted the possibility of differences in the prevalence and timing of onset of non-motor symptoms (REM sleep disorder, cognitive deficits), especially in PD with dementia (Goldwurm et al., 2006; Sun et al., 2016). In summary, the striking clinical overlap between *LRRK2* mutation carriers with PD and PD without *LRRK2* mutations suggests common disease mechanisms.

#### 4.1.2 | *LRRK2* and $\alpha$ -syn in lewy bodies and lewy neurites

Two years after the discovery of *LRRK2* as a gene responsible for autosomal-dominant forms of PD, Zimprich and

collaborators speculated that LRRK2 kinase activity may be responsible for the phosphorylation of  $\alpha$ -syn and that this effect may trigger its accumulation and aggregation (Zimprich et al., 2004). The authors found typical LB-dominant pathology, comparable to sporadic PD patients, in LRRK2 mutation carriers. These observations suggested that LRRK2, as a kinase, and  $\alpha$ -syn, as a kinase substrate, could physically interact. Later, Giasson and collaborators studied via immunohistochemistry three individuals with the G2019S LRRK2 mutation and concluded LRRK2 protein was not found in LBs or in LNs, in contrast to typical  $\alpha$ -syn pathology in these cases. However, studies including larger numbers of LRRK2 mutation carriers revealed that a proportion of cases, up to 1/3 of G2019S carriers of both non-Ashkenazi Jewish and European non-Ashkenazi Jewish descent were negative for Lewy bodies (Kalia et al., 2015). Although the total number of brains evaluated remains low, the number without Lewy bodies is high compared to typical late-onset disease brains evaluated from patients clinically diagnosed with PD.

There are several possibilities to interpret G2019S-LRRK2 carrier brains clinically diagnosed with PD that lack Lewy bodies. First, in the presence of the G2019S LRRK2 mutation, LBs may be more toxic than usual and cells that harbor them may not survive through late stages of disease. Second, the G2019S LRRK2 mutation favors smaller less-phosphorylated  $\alpha$ -syn inclusions or abnormal oligomers that are more difficult to detect than typical eosinophilic inclusions, and this drives disease in those patients. Third, the proportion of G2019S-LRRK2 carriers negative for LBs may experience disease onset and progression without the contribution of  $\alpha$ -syn. For example, some LRRK2 mutation carriers have been described with Tau tangle pathology. Unfortunately, there is typically insufficient clinical data associated with most tissues available to test whether disease characteristics and progression might be different in LRRK2 carriers with and with  $\alpha$ -syn LB burden. A PET tracer that might label  $\alpha$ -syn inclusions in life would effectively solve the riddle and such tracers are under active development. In the meantime, better clinical phenotyping within brain donation centers supported by LRRK2 mutation carriers seems vital to better understanding pathology linked to LRRK2.

#### 4.1.3 | SNCA genetic variants in modifying PD susceptibility in LRRK2 carriers

Genome-wide association (GWAS) studies indicate that variants in *SNCA* and *LRRK2*, independent from rare pathogenic missense mutations, are among the top genetic risk factors for PD susceptibility (Nalls et al., 2014; Satake et al., 2009; Simón-Sánchez et al., 2009). Studies focused on gene–gene interaction effects of *SNCA* and *LRRK2* found no significant evidence of an interaction between the two genes, although power is still limited due to low individual effect sizes of the

linked variants (Biernacka et al., 2011). Botta-Orfila and collaborators genotyped the *SNCA* polymorphism rs356219 in 84 Spanish LRRK2-associated PD patients carrying the G2019S mutation (Botta-Orfila et al., 2012). This single nucleotide polymorphism (SNP) is known to regulate *SNCA* expression in idiopathic PD-affected brain regions, blood, and plasma. Results showed that *LRRK2* mutation carriers carrying one or two *SNCA* rs356219-G alleles presented with an earlier PD onset than patients carrying the *SNCA* rs356219-A homozygote ( $55.37 \pm 1.54$  vs.  $64.19 \pm 2.8$  years respectively; Botta-Orfila et al., 2012). A similar study was performed in iPD patients, and the authors found that this SNP also influenced the age of onset (Cardo et al., 2012). These initial studies suggest that *SNCA* genetic variants could be a modifier of age of onset but not necessarily disease susceptibility (Botta-Orfila et al., 2012). Thus, these observations indirectly suggest that  $\alpha$ -syn may play a permissive role in *LRRK2* mutation carriers in disease.

#### 4.2 | Evidence of $\alpha$ -syn and LRRK2 interaction in animal models

In 2009, Lin et al. reported results from triple-transgenic mice with inducible A53T- $\alpha$ -syn and LRRK2 (WT or G2019S) under the *CaMKII* promoter-controlled tetracycline transactivator (tTA; *CaMKII-tTA*), or on a LRRK2 knockout background, to examine the role of LRRK2 in the progression of neuropathological alterations and phenotypes associated with mutant  $\alpha$ -syn. This heroic effort first determined the number of neurons that remained in the striatum of A53T/*LRRK2*WT and A53T/G2019S mice after months of expression; while the difference was not statistically significant in comparisons between WT-LRRK2 or G2019S-LRRK2 expression, a trend toward a decrease in the number of neurons in the A53T/G2019S striatum was reported. More convincingly, the inhibition of LRRK2 expression dramatically ameliorated  $\alpha$ -syn-induced neuropathology almost to the level of doxycycline-induced silencing of transgenic mutant  $\alpha$ -syn expression. Furthermore, the number of neurons at 12 months of age in the striatum of mice was significantly higher in the A53T/LRRK2<sup>-/-</sup> mice compared to A53T/LRRK2<sup>+/+</sup> mice. Moreover, no significant increase of astrogliosis, microgliosis, or somatic accumulation of  $\alpha$ -syn was detected in these mice. These experiments highlighted the potential link between WT-LRRK2 expression and  $\alpha$ -syn protein in neurodegeneration observed in PD, with a more speculative role for G2019S-LRRK2 in exacerbating  $\alpha$ -syn neurotoxicity (Lin et al., 2009).

Further testing the link between G2019S-LRRK2 and  $\alpha$ -syn neurotoxicity, in 2012 Herzig and collaborators reported tg mice that expressed human LRRK2 (WT or G2019S) with mice that expressed human  $\alpha$ -syn (A53T or WT) under the same neuron-specific promoter (Thy1 promoter; A53T/

G2019S; A53T/WT; WT/G2019S; Herzig et al., 2012). This strain of A53T- $\alpha$ -syn mice (Van der Putten et al., 2000) was known to develop motor coordination deficits in the rotarod test at 40 days of age and severe motor deficits, hypokinesia and weight loss at 6 months of age, although they lack the overt neurodegeneration that occurs in the Lin et al. study. The G2019S-LRRK2 tg mice showed no obvious brain pathology at 19 months of age, with no further decline of motor performance in double tg mice (Herzig et al., 2012). In 2017, Xiong and collaborators went back to the CamKII-induction approach to obtain a high expression level of G2019S-LRRK2 in the adult mouse forebrain, and consistent with Lin et al., these animals showed a nominal increase in  $\alpha$ -syn aggregation, especially in the cortex (Xiong et al., 2017). They obtained similar results in tg mice with a selective overexpression of G2019S-LRRK2 in the SNc, where they showed a degeneration of DA neurons and the aggregation of endogenous mouse  $\alpha$ -syn (Xiong et al., 2018). Potentially consistent, A53T- $\alpha$ -syn transgenic mice directed from the PrP promoter (Lee et al., 2002; see also: Giasson et al., 2002), when crossed with G2019S-LRRK2 mice expressing mutant LRRK2 under the control of the CMVe-PDGFb promoter, demonstrated mild enhancement of phosphorylated inclusions but did not worsen survival rates or other phenotypes (Daher et al., 2012; Ramonet et al., 2011).

Outside of traditional transgenic mice, the acute induction of  $\alpha$ -syn overexpression via viral vector or injection of preformed  $\alpha$ -syn fibrils also suggests a role for LRRK2 in  $\alpha$ -syn neurotoxicity. BAC-mediated expression of G2019S-LRRK2 in rats causes a very mild motor impairment with no dopaminergic cell loss even at 12 months of age (Lee & Cannon, 2015; Walker et al., 2014). However, injection of an AAV coding for  $\alpha$ -syn (Daher et al., 2015) in the SNc of these G2019S-LRRK2 rats induces a loss of TH-positive neurons that appears slightly more pronounced as compared to that seen in WT-LRRK2 rats. A larger effect was described in LRRK2 knockout rats that may be protected from viral vector-mediated  $\alpha$ -syn-induced dopaminergic neurodegeneration (delivered by an AAV; Daher, Volpicelli-Daley, Blackburn, Moehle, & West, 2014).

In summary, the effects of the G2019S LRRK2 mutation on  $\alpha$ -syn neurotoxicity and aggregation are mixed, with either mild or no effects reported in rodent studies. In contrast, phenotypes are generally more robust in the amelioration of  $\alpha$ -syn phenotypes in LRRK2 knockout rats and mice. For transgenic LRRK2 expression, it is important to note that except in Lin's study, the coexpression of both proteins ( $\alpha$ -syn and LRRK2) in the same anatomical region and in the same neurons is not precisely validated, thereby introducing a potential confounder to interpretation. In a recent study in primary hippocampal neurons, G2019S-LRRK2 expression mildly increases  $\alpha$ -syn fibril-induced inclusions but the effects of LRRK2 inhibition are much larger in reducing  $\alpha$ -syn

inclusion maturation (Volpicelli-Daley et al., 2016). Thus, it remains possible that, at least in part, G2019S-LRRK2 expression may mediate a cell autonomous (albeit subtle) mechanism in the aggregation of  $\alpha$ -syn in neurons. More convincingly interactions appear from LRRK2 inhibition or knockdown which implies a general effect of LRRK2 interacting with  $\alpha$ -syn in PD, outside of pathogenic mutations.

### 4.3 | Molecular mechanisms to explain the interaction of LRRK2 and $\alpha$ -syn in PD

An important interaction between LRRK2 and  $\alpha$ -syn may plausibly occur within cells that express both proteins at the same time (i.e., cell-autonomous), or through the interaction of cells important in disease that express one protein or the other (i.e., non-cell-autonomous). For example, in neurons, LRRK2 might modulate total  $\alpha$ -syn levels (synthesis or degradation levels), levels of a posttranslational modification in  $\alpha$ -syn, modulate  $\alpha$ -syn aggregation through changing interactions with  $\alpha$ -syn-interacting proteins, or change the subcellular compartments where  $\alpha$ -syn normally resides. Within cells that express both LRRK2 and  $\alpha$ -syn, understanding their interaction may shed light on how key organelles regulate survival, for example through mitochondria or endolysosome function. Alternatively, LRRK2 and  $\alpha$ -syn might be functionally linked through mechanisms involving cell-cell interactions. For example, cells of the innate immune system involved in neuroinflammation that carry high levels of LRRK2 (mutated or with particular polymorphisms) could have increased sensitivity to the presence of aggregated  $\alpha$ -syn in the brain. The complexity of the potential functional interaction between  $\alpha$ -syn and LRRK2 may also involve different types of glial cells that act on one another in neuroinflammatory processes, namely astrocytes and microglial cells (Liddel et al., 2017).

Neuron-neuron interaction might also play a role in the apparent spread of abnormal  $\alpha$ -syn from one susceptible brain area to the next. Whether the cellular mechanisms dictating  $\alpha$ -syn interaction with LRRK2 are cell-autonomous or non-cell-autonomous or some combination, therapeutic targeting of LRRK2, for better or worse, is almost exclusively focused on inhibiting LRRK2 kinase activity. In the second part of this review, we shall emphasize the different directions of research that provide yet imperfect but promising answers.

### 4.4 | LRRK2 activity in $\alpha$ -syn expression and aggregation

As the endogenous levels of  $\alpha$ -syn phosphorylation are low in the unaggregated state, the phosphorylation state of  $\alpha$ -syn, notably on Serine 129, is an excellent readout of the aggregation of  $\alpha$ -syn. In recent studies, G2019S-LRRK2 KI mice or G2019S-LRRK2-expressing rats exhibited significantly

higher levels of pSer129  $\alpha$ -syn in the striatum compared to WT controls (Longo et al., 2017; Volpicelli-Daley et al., 2016). LRRK2 could affect the subcellular localization of  $\alpha$ -syn, notably its membrane association, promoting the aggregation by increasing the cytosolic pool of  $\alpha$ -syn. Through G2019S-LRRK2 upregulation of total levels of  $\alpha$ -syn, the net effect may also be an increase in the aggregation-prone cytosolic pool. In SH-SY5Y cells studied by Kondo, Obitsu, and Teshima (2011), the aggregation capacity of  $\alpha$ -syn was evaluated in the presence or absence of G2019S-LRRK2. Cell viability decreases when the cells are cotransfected with  $\alpha$ -syn and G2019S-LRRK2 but also with WT-LRRK2 whereas viability remains unchanged in presence of each protein alone. In differentiated cells,  $\alpha$ -syn-containing vesicles are not produced when the cells are transfected with  $\alpha$ -syn alone. In contrast, the cotransfection of  $\alpha$ -syn with G2019S-LRRK2 induces the formation of aggregates and vesicles. Most of the  $\alpha$ -syn aggregates colocalize with the mitochondrial outer-membrane marker TOM20 in cells cotransfected with  $\alpha$ -syn and G2019S-LRRK2 but not with the WT form of LRRK2. In 2014, Skibinski and collaborators demonstrated that the neurotoxicity caused by G2019S-LRRK2 could be mitigated through knockdown of  $\alpha$ -syn (Skibinski, Nakamura, Cookson, & Finkbeiner, 2014). More recently, a study in primary cortical neurons from homozygous G2019S-LRRK2 KI mice shows that expression of G2019S-LRRK2 induced the accumulation of endogenous, detergent-insoluble  $\alpha$ -syn, and that this effect can be reversed through pharmacological inhibition of LRRK2 kinase activity (Schapansky et al., 2018). Altogether, these observations indicate that LRRK2 can accelerate aggregation of  $\alpha$ -syn, and possibly the localization of the aggregates, but the precise mechanisms have yet to be fully elucidated.

#### 4.5 | LRRK2 mediation of $\alpha$ -syn cell-to-cell propagation

It is now generally established that  $\alpha$ -syn can propagate via the synapse in model systems in vitro, particularly those that use triple-chamber systems. In 2011, Volpicelli-Daley and colleagues observed this cell-to-cell transmission in chambered cultured neurons with bath-application of preformed  $\alpha$ -syn fibrils (Volpicelli-Daley et al., 2011). Kondo and collaborators also studied the cell-to-cell transmission of  $\alpha$ -syn through evaluating exocytosis of  $\alpha$ -syn in the media and the internalization in neighboring neuroblastoma cells (Kondo et al., 2011). In this system, G2019S-LRRK2 significantly enhances  $\alpha$ -syn release into the conditioned media. Interestingly, the phosphorylation state of  $\alpha$ -syn is not different in the cells cotransfected compared to cells transfected with  $\alpha$ -syn alone, suggesting that LRRK2 can influence the propagation mechanism but not the phosphorylation state of  $\alpha$ -syn (Kondo et al., 2011). These preliminary observations

warrant further investigations into LRRK2 mediation of cell-to-cell transmission of abnormal  $\alpha$ -syn.

#### 4.6 | Impact of LRRK2 on $\alpha$ -syn-induced neuroinflammation

Evidence of on-going neuroinflammation in affected brain regions in PD first comes from analysis of brain tissue for reactive microglia and analyses of proinflammatory cytokines like Interferon gamma, (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin-1 $\beta$ , (IL-1 $\beta$ ; Hunot et al., 1999; McGeer, Itagaki, & McGeer, 1988; Mogi et al., 1994, 1996). In addition, GWAS studies point to polymorphisms in loci with genes related to immunity (e.g., MHC-II genes). Neuroinflammation can be seen as a defense reaction that involves both the adaptive and innate immune systems, occurring in the central nervous system (CNS) after an event that perturbs “normal” homeostasis (reviewed in Gelders, Baekelandt, & Van Der Perren, 2018; Xanthos & Sandkühler, 2014). It is widely accepted that neuroinflammation occurs in many different acute and chronic neurological disorders. Whether it is only a consequence of neurodegeneration or is also actually a key active player favoring or opposing neurodegeneration is unknown. Presenting extensively the *pros* and *cons* of these different hypotheses on the role of neuroinflammation in degenerative diseases is out of the scope of the present review. Comprehensive overview of this aspect of PD pathogenesis can be found extremely well-reviewed elsewhere (Skaper, Facci, Zusso, & Giusti, 2018). In brief, number of experimental observations in animal models and neuropathological findings in postmortem tissue from PD patients support the view that neuroinflammation modulates neurodegeneration. For example, in the acute model of PD in animals using the mitochondrial toxin MPTP, signs of neuroinflammation, including activated microglial cells, appear in the substantia nigra pars compacta (SNpc) before actual loss of dopaminergic cells (Liberatore et al., 1999). Similar findings have been recently reported in a model using intrastriatal injection of preformed  $\alpha$ -syn fibrils (Duffy et al., 2018) and in a model of  $\alpha$ -syn overexpression using AAV injection into the SN. In these synuclein-related models, the presence of reactive microglia cells and proinflammatory molecules precedes neurodegeneration of dopaminergic neurons. Blockage/inhibition of signaling pathways linked to neuroinflammation reduces the loss of dopaminergic cells induced by MPTP (Maatouk et al., 2018; Wu et al., 2002). In models of PD using overexpression of  $\alpha$ -syn, cellular pathways that trigger activation of microglial cells (such as Toll-like Receptors) favor neurodegeneration (Wong & Krainc, 2017). In line with this, it has been recently showed that the inhibition of the microglia-induced activation of astrocytes using agonists of the Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1R) into their neurotoxic phenotype protects against  $\alpha$ -syn toxicity in



mouse models (Yun et al., 2018). However, all facets of neuroinflammation are not detrimental and to some extent, there are molecular components and signaling pathways linked to the regulation of immune and glial cells that play a protective role in PD models. For example, the partial ablation of microglial cells increases the vulnerability to MPTP in mice (Yang et al., 2018). The overexpression of  $\alpha$ -syn produces changes in activated microglial cells leading not only to the production of proinflammatory molecules (e.g., iNOS and IL1-beta) but also anti-inflammatory molecules (e.g., Heme oxygenase-1; Lastres-Becker et al., 2012).

LRRK2 is expressed not only in neurons in the brain but also in some subsets of immune cells that include myeloid cells (Isolectin B4 positive, CD68 positive) in pathological conditions (Daher et al., 2014; Moehle et al., 2012). In the periphery, LRRK2 is found to be expressed in monocytes with much lower expression in T cells involved in the adaptive immune system, suggesting a role for LRRK2 in the innate immune system (Thévenet, Gobert, van Huijsduijnen, Wiessner, & Sagot, 2011). GWAS studies show LRRK2 variants implicated in the heritability of Crohn's disease, a type of inflammatory bowel disease (IBD) that may affect any part of the gastrointestinal tract (Barrett, Hansoul, Nicolae, & Cho, 2008), as well as mycobacterium infection (Marcinek et al., 2013; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2009). Following, studies by Gardet and Hakami both suggest important roles for LRRK2 in the maturation of myeloid cells that offer host protection from infection (Gardet et al., 2010; Hakami et al., 2011). This suggests that LRRK2 plays a role in innate immune responses not only in the nervous system but also in the periphery. The exact role of LRRK2 in the inflammatory response has not been characterized but these and other recent studies converge toward the observation that LRRK2 kinase inhibition or LRRK2 knockdown attenuates proinflammatory signaling in vitro and in vivo (Kim et al., 2012; Ma et al., 2015; Puccini et al., 2015; Russo et al., 2015).

The role of mutated LRRK2 in inflammatory processes has been recently shown. Kozina and colleagues demonstrated that in transgenic mice overexpressing mutant LRRK2, intraperitoneal injection of LPS is able to trigger a long-term inflammation associated with neurodegeneration of DA neurons in the SNpc, which is not the case in mice overexpressing the human wild type LRRK2 or wild type mice (Kozina et al., 2018). This change produced by mutant LRRK2 is not directly linked to activation of innate brain cells but may be linked to a type II interferon immune response in peripheral cells. However, this does not rule out the possible role of LRRK2 in the regulation of brain immune cells, in particular microglia.

Microglial cells are resident innate immune cells and professional phagocytes of the brain, as well as the first line of defense against pathogens. In neurodegenerative disorders, there are roles in clearing aggregated proteins and the clearance

of dead cells and other debris. Microglia can switch from a resting state (ramified phenotype) into an activated state (ameboid phenotype) through signaling molecules that mediate activation (e.g., MAPK subtypes p38, JNK, and ERK). A failure in the appropriate and proportional activation process of microglia can have dramatic consequences. Excessive activation can lead to an abundant secretion of inflammatory mediators and reactive oxygen species that are cytotoxic to neurons. LPS (lipopolysaccharide) treatment, in vitro or in vivo, is known to induce a TLR4-mediated inflammatory response and microglial activation. In primary microglial cells, LPS exposure can induce the switch between the resting phenotype to the activated phenotype with an extension of processes into the environment and eventually a retraction into an ameboid morphology. In cultured microglial cells isolated from tg mice overexpressing R1441G-LRRK2 or WT littermates, LPS treatment induces an increase in LRRK2 protein expression that is not reflected at the mRNA level, suggesting that LPS treatment can impact the turn-over of LRRK2 (Gillardon, Schmid, & Draheim, 2012; Moehle et al., 2012). In addition, R1441G-LRRK2 expression increases expression and secretion of proinflammatory cytokines (TNF) compared to WT microglia in culture (Gillardon et al., 2012). LRRK2 inhibitors, LRRK2-IN-1 and sunitinib, were found to attenuate the release and transcriptional induction of TNF and reduce phospho-p38 protein levels. Similarly, knockdown of LRRK2 by a lentivirus coding for a shRNA targeting LRRK2 has the same effect, except for the phosphorylation of p38 that remains unchanged by LRRK2 shRNA. More interestingly, in the presence of LRRK2 inhibitors or LRRK2 shRNA, the LPS treatment fails to induce the switch between the resting phenotype to the activated phenotype (Moehle et al., 2012). The knockdown of LRRK2 in the microglial cell line BV-2 by lentiviral vectors encoding a shRNA significantly reduces the secretion of TNF $\alpha$  and IL-6 with an increase of NO production as compared to control conditions. Treatment with LPS in these knockdown cells induces a decrease in the level of the phosphorylated form of p38 and induces a significant reduction of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) transcriptional activity while JNK and ERK are unaffected (Kim et al., 2012). LRRK2 enhances the association of NFAT1 with proteins that seem to block the NFAT transport to the nucleus and thus inhibits the transcription of immune response genes (Liu et al., 2011). Microglia isolated from LRRK2 KO mice have an increased  $\alpha$ -syn uptake and clearance when treated with recombinant  $\alpha$ -syn, compared to WT mice microglia (Maekawa et al., 2016). In these studies, primary microglia and cell lines in culture adopt a macrophage-like phenotype on a transcriptional and functional level, necessitating studies in vivo with a preserved dynamic innate immune system (Butovsky et al., 2014).

In LRRK2 knockout rats as well as LRRK2 knockout mice, LPS and Tat-induced neuroinflammation

(respectively) are dramatically dulled compared to WT rodents (Daher et al., 2014; Puccini et al., 2015). The absence of LRRK2 protects from neurodegeneration induced by an AAV coding for  $\alpha$ -syn (Daher et al., 2014). Like LPS, injections of viral vectors coding  $\alpha$ -syn are known to induce microglial activation. In this study, the number of CD68-positive cells recruited in response to  $\alpha$ -syn expression is reduced in LRRK2 KO rats compared to WT rats. The morphology of IBA1-positive cells shifts to the amoeboid (activated) phenotype in WT rats injected with  $\alpha$ -syn that was not observed in LRRK2 KO rats also injected with  $\alpha$ -syn. In addition, treatment with PF-06447475 attenuates the neuroinflammation in G2019S-LRRK2-BAC Tg rats when compared to untreated animals and to non-Tg rats expressing WT rat LRRK2 after the injection of AAV- $\alpha$ -syn (Daher et al., 2015). Overall, it seems likely that LRRK2 modulates the inflammatory response induced by  $\alpha$ -syn. It could be imagined that G2019S-LRRK2 could increase the neuroinflammation induced by  $\alpha$ -syn, therefore aggravating the deleterious effects of this neuroinflammation. Selective LRRK2 mutant expression or knockdown within cells of the immune system has not yet been described, limiting interpretations of mechanisms.

Many studies have correlated  $\alpha$ -syn aggregates with activated microglia, MHC-II expression, and neuroinflammation. Studies in human postmortem PD brain show that MHC-II detection of microglia is as good as detection of phosphorylated  $\alpha$ -syn for staging the severity of PD brains pathology (Imamura et al., 2003).  $\alpha$ -Syn fibrils, perhaps all fibrillized amyloid proteins, are substrates of TLR2 expressed in cells of the innate immune system, and can activate MyD88 pathways similar to TLR4 agonists (e.g., LPS).  $\alpha$ -Syn fibrils and aggregates may bind to and activate both TLR2 and TLR4 (Codolo et al., 2013; Daniele et al., 2015; Gustot et al., 2015; Kim et al., 2013). The implication is that abnormal  $\alpha$ -syn activates an immune response that may be potentiated by mutant LRRK2 expression. Alternatively, LRRK2 activity may initiate an abnormal immune response that causes  $\alpha$ -syn to aggregate in neurons, with the immune response further potentiated in perpetuity with  $\alpha$ -syn aggregates interacting with toll-like receptors. Future studies can dissect these possibilities.

#### 4.7 | LRRK2, $\alpha$ -syn, and 14-3-3s

Among all the pathways plausibly affected by  $\alpha$ -syn and LRRK2, one possibility is that a common protein interactor could weave together the two proteins in a cell in response to specific stimuli. The 14-3-3 chaperone-like protein family is known to interact robustly with both  $\alpha$ -syn and LRRK2, as well as becomes entrapped in LBs in PD (Berg, Holzmann, & Riess, 2003; Kawamoto et al., 2002; Nichols et al., 2010). In 2002, Xu and collaborators showed that 14-3-3 proteins

interact with  $\alpha$ -syn in a 54–83-kD complex (Xu et al., 2002). 14-3-3 sequestration in LBs, plausibly mediated by an interaction with  $\alpha$ -syn, may cause loss of 14-3-3 function and lowered antiapoptotic activity and lead to toxicity and cell death. Moreover, expression of 14-3-3 theta is significantly decreased in tg mice overexpressing human WT- $\alpha$ -syn under the platelet-derived growth factor beta promoter (Yacoubian et al., 2008). In dopaminergic cells, the level of tyrosine hydroxylase can be modulated both with  $\alpha$ -syn and 14-3-3 expression. 14-3-3 proteins are known to interact with phosphorylated TH to enhance its activity and to promote dopamine synthesis.  $\alpha$ -Syn in turn may bind to unphosphorylated TH to reduce its activity (for more details see Review from Berg et al., 2003). This is a compelling example of how 14-3-3 and  $\alpha$ -syn binding to each other may manipulate cell phenotypes associated with a rate-limited enzyme (TH) critical for neuronal phenotypes.

As with  $\alpha$ -syn and LRRK2, 14-3-3 proteins themselves are subject to phosphorylation. In 2015, Slone and collaborators found that modulation of 14-3-3 phosphorylation reduced their neuroprotective potential (Slone, Lavalley, McFerrin, Wang, & Yacoubian, 2015). 14-3-3 binding to LRRK2 is mediated by the LRRK2 Ser910 and 935 phosphorylation sites (Gloeckner et al., 2010; Nichols et al., 2010; West et al., 2007). Oxidative stress may promote dephosphorylation of LRRK2 causing a loss of 14-3-3 binding to LRRK2 (Mamais et al., 2014). Disruption of 14-3-3 binding to LRRK2 alters LRRK2 localization in the cell and potentially affects LRRK2 kinase activity and membrane-related functions, such as exosome release (Dzamko et al., 2010; Mamais et al., 2014). 14-3-3 binding to LRRK2 could prevent the dephosphorylation of LRRK2 and may stabilize LRRK2 structure. In 2017, Civiero and collaborators showed in vitro that the serine/threonine kinase PAK6 bound and phosphorylated 14-3-3gamma at its Ser59 residue, thus promoting 14-3-3 gamma/LRRK2 complex dissociation. In neurons, the activation of this kinase rescues G2019S-LRRK2 neurotoxicity (Civiero et al., 2017). Other recent work concluded that 14-3-3 binding to LRRK2 could control LRRK2 kinase activity (Lavalley et al., 2016). 14-3-3 binding to LRRK2 prevents LRRK2 kinase activity and autophosphorylation, whereas a loss of 14-3-3 expression and binding result in hyperactivated LRRK2 and exacerbate LRRK2 neurotoxicity. In a cell autonomous manner,  $\alpha$ -syn-mediated sequestration of 14-3-3 proteins may hyperactivate LRRK2 kinase activity, encourage proapoptotic pathways, and reduce levels of dopamine synthesis needed for proper basal ganglia function.

#### 4.8 | $\alpha$ -Syn, LRRK2, and mitochondria

Mitochondria have been a favorite organelle for study in PD-related research stemming back to postmortem descriptions of a complex I deficiency in the striatum (Mizuno et al.,

1989) and in the SNc (Schapira et al., 1990) of PD patients. Mitochondrial complex I inhibitors (e.g., rotenone or MPTP) can also induce parkinsonism in exposed people as well as in rodents (Langston & Ballard, 1983; Schapira, 2008). Mutations in the genes encoding PARKIN, DJ-1, and PINK1 cause autosomal recessive forms of PD, and these proteins are all involved in mitochondrial quality control (reviewed in Dawson, Ko, & Dawson, 2010). In rodents, endogenous as well as exogenously administered  $\alpha$ -syn (WT or A53T) localizes in part to mitochondria (Chinta, Mallajosyula, Rane, & Andersen, 2010; Li et al., 2007; Martin et al., 2006; Nakamura et al., 2008; Subramaniam, Vergnes, Franich, Reue, & Chesselet, 2014; Zhang et al., 2008).  $\alpha$ -Syn may directly interact with TOM20 (translocase of the outer mitochondrial membrane) and inhibit mitochondrial protein import (Di Maio et al., 2016). Moreover, partial homology to mitochondrial targeting sequence was found in the N-term portion of  $\alpha$ -syn.  $\alpha$ -Syn binding to mitochondrial membranes appears particularly high in the striatum, in the SNc and in the cortex of PD brains, regions highly affected in PD pathology (Devi, Raghavendran, Prabhu, Avadhani, & Anandatheerthavarada, 2008).  $\alpha$ -Syn import to mitochondria may depend on intracellular pH (Cole, DiEuliis, Leo, Mitchell, & Nussbaum, 2008) and on mitochondrial membrane potential and the ATP pool (Devi et al., 2008). In vitro, about 10% of total LRRK2 protein localizes to a mitochondrial enriched protein fraction (West et al., 2005), although a lower percentage is probably associated with the outer mitochondrial membrane without significant levels detected inside mitochondria (Biskup et al., 2006).

Studies in model systems with increased or abnormal  $\alpha$ -syn expression, or mutant LRRK2, have demonstrated compromised mitochondrial function such as decreased mitochondrial membrane potential and ATP production and increased oxidative stress (Butler et al., 2012; Erustes et al., 2017; Martin et al., 2006; Martinez et al., 2018; Melo, van Zomeren, Ferrari, Boddeke, & Copray, 2016; Mortiboys et al., 2015; Mortiboys, Johansen, Aasly, & Bandmann, 2010; Papkovskaia et al., 2012; Parihar, Parihar, Fujita, Hashimoto, & Ghafourifar, 2008; Sarafian et al., 2013; Su & Qi, 2013; Wang et al., 2012). While  $\alpha$ -syn null mice are protected against MPTP toxicity, and tg mice overexpressing human  $\alpha$ -syn may be more sensitive to MPTP-induced toxicity (Dauer et al., 2002; Klivenyi et al., 2006; Song, Shults, Sisk, Rockenstein, & Masliah, 2004), LRRK2 knockout mice do not appear protected from MPTP (Andres-Mateos et al., 2009). However, mice overexpressing G2019S-LRRK2 appear more sensitive to MPTP (Karuppagounder et al., 2015). Thus, at least through MPTP, both  $\alpha$ -syn and LRRK2 appear to have a functional role in mitochondria-dysfunction that can cause neurodegeneration.

While the mechanism of how LRRK2 interacts with mitochondria is speculative at this time, several studies may

shed light on  $\alpha$ -syn interaction with mitochondria.  $\alpha$ -Syn KO mice present with reductions of mitochondria respiration and linked CI/III activity (Ellis et al., 2005), and tg mice expressing  $\alpha$ -syn A53T in DA neurons present an age-related mitochondrial CI inhibition (Chinta et al., 2010). Devi and collaborators have identified in 2008, a large decrease in CI activity associated with abnormal  $\alpha$ -syn, both in human fetal primary cortical neuronal cultures overexpressing  $\alpha$ -syn and in mitochondria isolated from the ST and SN of autopsy brain hemispheres from PD subjects (Devi et al., 2008) and these results have been reproduced in other in vitro models (Loeb, Yakunin, Saada, & Sharon, 2010; Reeve et al., 2015). Mitochondria isolated from Wistar rats exposed to different concentrations of recombinant human  $\alpha$ -syn also show a dose-dependent decrease in CI activity (Liu et al., 2009).

Potentially corroborating these results, Tg mice expressing A53T- $\alpha$ -syn display dysmorphic mitochondria (Martin et al., 2006). Double tg mice  $\alpha$ -syn/parkin KO have marked alterations of mitochondrial architecture, especially in the SN and cortex (Stichel et al., 2007). Similarly, tg A53T mice show changes in mitochondrial morphology and decreased mitochondrial interconnectivity (Xie & Chung, 2012) and even fragmented mitochondria that appear before DA neuron loss (Chen, Xie, Turkson, & Zhuang, 2015). In vitro,  $\alpha$ -syn knockdown increases the number of cells presenting elongated mitochondria (Kamp et al., 2010) and overexpression of both WT and A53T- $\alpha$ -syn induced the fragmentation of mitochondria (Butler et al., 2012; Devoto et al., 2017; Guardia-Laguarta et al., 2014; Martinez et al., 2018) that precedes any disturbance in mitochondrial function and cell death (Nakamura et al., 2011). This effect of  $\alpha$ -syn on mitochondrial fragmentation was also shown in DA neurons derived from patients with the A53T mutation (Ryan et al., 2018). Moreover, this  $\alpha$ -syn-dependent mitochondrial fragmentation requires a direct interaction with the outer mitochondrial membrane in iPS overexpressing  $\alpha$ -syn (Devoto et al., 2017). In primary mouse cortical cultures, astrocytes internalize  $\alpha$ -syn oligomers causing mitochondrial fragmentation after a 24-hr exposure (Lindström et al., 2017). In particular, Grassi and collaborators recently identified a conformationally distinct phosphorylated  $\alpha$ -syn species (resulting from the incomplete degradation of fibrillar  $\alpha$ -syn) that associates with mitochondria to induce mitochondrial dysfunction (Grassi et al., 2018). More precisely, significant reductions of Mfn1 and 2 proteins were observed in tg A53T mice with no changes in Drp1 or OPA1 (Xie & Chung, 2012). Drp1 mostly locates in the cytoplasm, but is stimulated after fission stimuli to migrate to the mitochondria. In Drp1 KO mice, the overexpression of WT- $\alpha$ -syn still induces significant fragmentation of mitochondria, even though it is still less important than in the WT mice, implying that  $\alpha$ -syn-induced mitochondrial fragmentation might go through an effect on Drp1, but that it would not be the only mechanism



(Nakamura et al., 2011). Thus, these findings suggest that the fragmentation of mitochondria caused by  $\alpha$ -syn aggregation and expression decreases mitochondrial fusion, rather than an increase in fission.

LRRK2 may interact with Drp1 to enhance Drp1 mitochondrial translocation, and the blockage of Drp1 inhibits mitochondrial fragmentation and dysfunction (Niu, Yu, Wang, & Xu, 2012; Su & Qi, 2013; Wang et al., 2012). G2019S-LRRK2 might phosphorylate Drp1 leading to mitochondrial fragmentation (Su & Qi, 2013). Through this pathway, LRRK2 kinase activity could activate Drp1 and enhance its localization to mitochondria, therefore tipping the balance in favor of mitochondrial fission. Supporting this hypothesis, LRRK2 (and not its dead kinase mutant) enhances ROS production, which is known to lead to increased fission (Niu et al., 2012). However, Saez-Atienzar and collaborators observed the opposite effects: in their *in vitro* study, it was the pharmacological inhibition of LRRK2 that led to a Drp1-dependent increase in mitochondrial fission (Saez-Atienzar et al., 2014). Similarly, there is no conclusion as to the effect of LRRK2 expression or activity on mitochondrial morphology. In a *tg* fly model, the expression of G2019S-LRRK2 is associated with mitochondrial deformity (Mortiboys et al., 2015). *In vitro*, in cell lines, the expression of WT-LRRK2, and even more that of G2019S or R1441C-LRRK2 induces mitochondrial fragmentation (Su & Qi, 2013; Wang et al., 2012). Interestingly, this effect seems to be kinase-dependent, which is consistent with the fact that the G2019S mutant has more pronounced effects on mitochondria (Su & Qi, 2013; Wang et al., 2012). However, two other studies demonstrated the opposite results in fibroblasts derived from PD patients carrying the G2019S mutation, one observing an increased mitochondrial fragmentation, pointing toward a misbalance in favor of mitochondrial fission (Niu et al., 2012), and the other enhanced mitochondrial elongation and interconnectivity, pointing toward a misbalance in favor of mitochondrial fusion (Mortiboys et al., 2010). Further, the direct effect of LRRK2 on mitochondrial respiration is not clear. In HEK cells, the expression of WT-LRRK2, and to a further degree G2019S, decreases both CI and CIV activities (Su & Qi, 2013). In other model systems, *tg* flies expressing G2019S, G2385R, or I2020T-LRRK2 are more sensitive to rotenone-induced toxicity (Ng et al., 2009; Venderova et al., 2009), and in *Caenorhabditis elegans*, WT-LRRK2 but not G2019S-LRRK2 expression protects against rotenone-induced toxicity (Saha et al., 2009).

Taken together, these studies may imply that LRRK2 and  $\alpha$ -syn can have a direct effect on the mitochondrial respiratory chain, leading to mitochondrial dysfunction and altered energy production. However, second hypothesis that links LRRK2 and  $\alpha$ -syn with the disruption of the equilibrium between mitochondrial fission and fusion also seems plausible. All the data showing an effect of  $\alpha$ -syn and LRRK2

on the toxicity of complex I inhibitors point toward a potential effect of  $\alpha$ -syn and LRRK2 on mitochondrial respiratory chain, more precisely on CI activity. These complex I defects can lead to oxidative stress, a decrease in ATP production or in mitochondrial respiration (Devi et al., 2008; Loeb et al., 2010; Reeve et al., 2015). All of these events ending up in mitochondrial dysfunction could therefore be a relevant explanation for the mitochondrial deficits induced by  $\alpha$ -syn and LRRK2. As mitochondrial homeostasis is a finely regulated process with a precise equilibrium between fission (involving the proteins Drp1 (Dynamin-related protein 1), Fis1 and GDAP1) and fusion (involving the proteins Mfn 1 and 2 and OPA1), mitochondrial fragmentation can reflect an increase in mitochondrial fission or a decrease in mitochondrial fusion. Overall, these results suggest that  $\alpha$ -syn and LRRK2 have the potential for a common effect on two major aspects of mitochondrial homeostasis: the energy production and the dynamics of mitochondria. However, there is a tight relationship between the structure and the energy function of the mitochondrial network, and an alteration of one aspect has repercussions on the other. It is therefore difficult to know which effect comes first, but newer model systems with conditional manipulation of LRRK2 and  $\alpha$ -syn may shed light onto the relationship between these proteins, mitochondrial respiratory chain function and fusion and fission events.

#### 4.9 | $\alpha$ -Syn, LRRK2, and autophagy

Proteins can be removed by the ubiquitin–proteasome system (UPS) as well as the autophagy–lysosome pathway (ALP), and both have been extensively evaluated with respect to LRRK2 and  $\alpha$ -syn in PD models.  $\alpha$ -Syn degradation via the UPS was observed and UPS dysfunction was predicted to lead to  $\alpha$ -syn accumulation in early studies (Bennett et al., 1999; McNaught et al., 2002; Tofaris, Layfield, & Spillantini, 2001; Webb, Ravikumar, Atkins, Skepper, & Rubinsztein, 2003). However, other groups failed to show an involvement of the proteasome machinery in this process (Ancolio, Alves Da Costa, Uéda, & Checler, 2000; Rideout, Larsen, Sulzer, & Stefanis, 2001; Rideout & Stefanis, 2002; Vogiatzi, Xilouri, Vekrellis, & Stefanis, 2008) suggesting another pathway to  $\alpha$ -syn degradation such as ALP (Petroi et al., 2012). Given the close overlap between LRRK2 and  $\alpha$ -syn in other pathways we describe here, LRRK2 function may shed light on this controversy.

Autophagy clears cytoplasmic components through three distinct pathways depending of the way substrates reach the lysosomal lumen and the types of substrates supported: chaperone-mediated autophagy (CMA), macroautophagy, and microautophagy (Cuervo, 2004; Levine & Klionsky, 2004). In contrast, the UPS mainly drives short-lived protein degradation, typically via polyubiquitin chains, whereas autophagy is responsible for long-lived proteins, larger

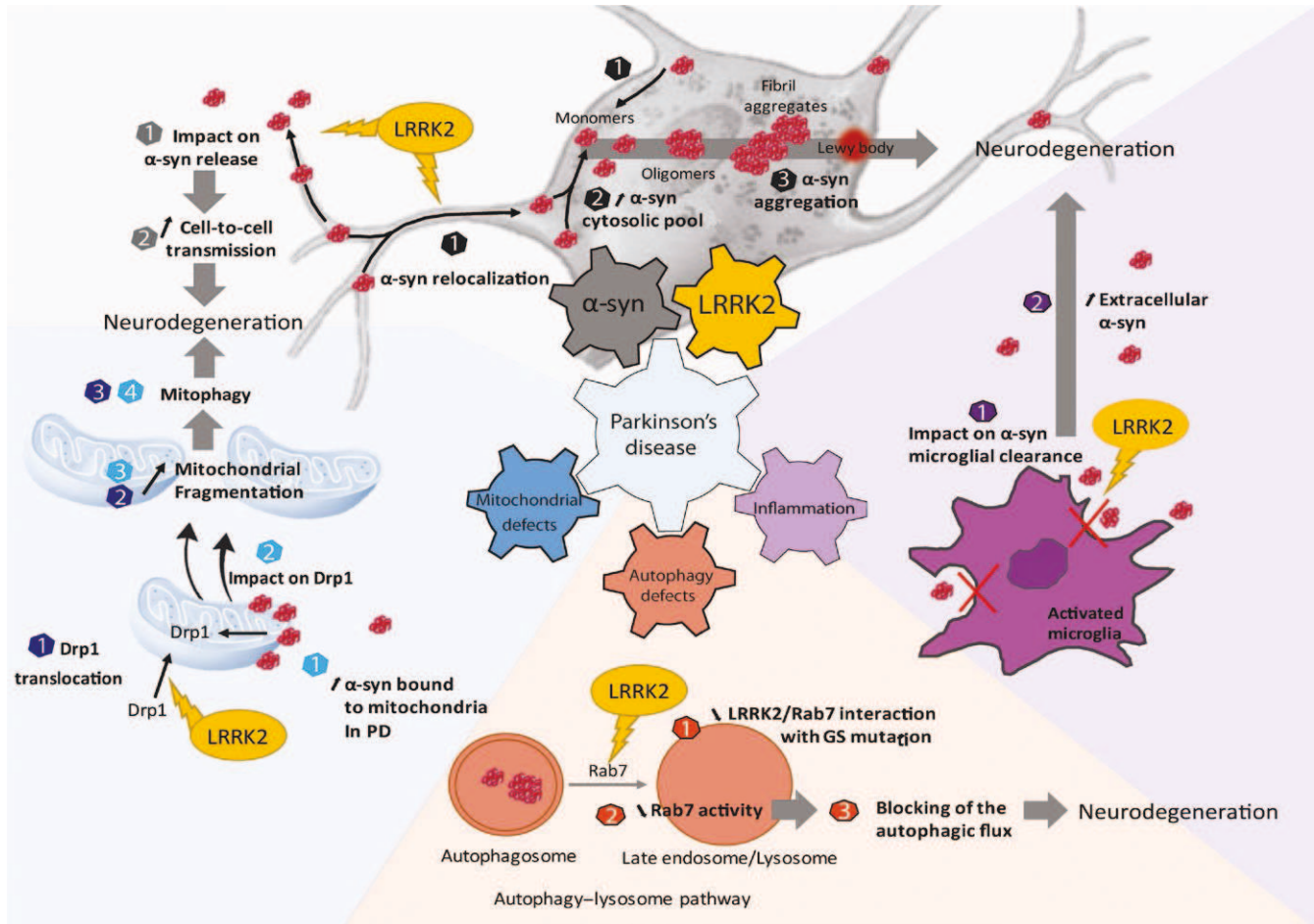


protein aggregates, and cytoplasmic organelles (Zhang, Dong, Xu, & Xu, 2012). CMA involves chaperone proteins (especially hsc70) which bind target proteins containing a KFERQ peptide motif. These chaperones address the proteins to lysosomes where they interact with the lysosomal receptor, LAMP2a, the rate-limiting step in CMA (Cuervo & Dice, 1996; Majeski & Fred Dice, 2004; Massey, Kiffin, & Cuervo, 2004). At the membrane, LAMP2a multimerizes to allow substrate translocation inside the lysosome with the help of lys-hsc70, an intraluminal chaperone (Agarraberes, Terlecky, & Dice, 1997; Cuervo, Dice, & Knecht, 1997). Macroautophagy involves the creation of a double membrane structure, named phagophore, engulfing proteins and organelles. Closure completion of the phagophore forms the autophagosome which will fuse with lysosomes to generate the autolysosome, where substrates are degraded. Mitophagy is a subtype of macroautophagy which leads to dysfunctional mitochondria degradation (Shintani & Klionsky, 2004). The molecular machinery participating in macroautophagy is composed of different types of proteins, including Atg proteins and Beclin. Microautophagy involves the engulfment and internalization (pinocytosis) of small quantities of cytosol components directly by lysosomes (Massey et al., 2004; Müller et al., 2000). In PD brains, autophagic characteristics were shown through immunohistochemistry (Anglade, Vyas, Hirsch, & Agid, 1997) and impairment of autophagy (defective clearance of autophagosomes and lysosomal depletion) was observed in PD patient brains (Dehay et al., 2010). Additionally, LAMP2a and HSC70 protein levels in the SNc of PD patient brains were decreased (Alvarez-Erviti et al., 2010).

The potential degradation of  $\alpha$ -syn by CMA is suggested since the protein contains a CMA recognition motif (95-VKKDQ-99; Cuervo, Stefanis, Fredenburg, Lansbury, & Sulzer, 2004; Fred Dice, 1990). First evidence confirming this hypothesis was depicted incubating  $\alpha$ -syn with isolated liver lysosomes showing its degradation in a CMA-dependent manner (Cuervo et al., 2004). Evidence of  $\alpha$ -syn degradation by CMA is also demonstrated in cell lines and neurons using lysosomal inhibitors which lead to  $\alpha$ -syn accumulation (Lee, Khoshaghideh, Patel, & Lee, 2004; Paxinou et al., 2001; Webb et al., 2003). In 2004, Cuervo and collaborators also demonstrated that the mutant forms of  $\alpha$ -syn (A53T and A30P) can bind to lysosome membranes but cannot be engulfed and degraded efficiently by lysosomes. In fact, mutant  $\alpha$ -syn interacts more strongly with LAMP2a, blocking CMA (Cuervo et al., 2004). In different cell lines and in primary neuronal cells, mutant  $\alpha$ -syn interaction with LAMP2a and impairment of CMA are also demonstrated (Vogiatzi et al., 2008). More recently, decreasing LAMP2a expression through a strategy of shRNA-AAV injections in rat brain results in intracellular accumulation of  $\alpha$ -syn and autophagic vacuoles (Xilouri et al., 2016). Additionally, when

the recognition motif 95-VDKKQ-99 is mutated, CMA is dysfunctional and compensatory mechanisms occur with the activation of macroautophagy (Vogiatzi et al., 2008; Xilouri, Vogiatzi, Vekrellis, Park, & Stefanis, 2009). In cell culture, LAMP2a silencing blocks CMA but upregulates macroautophagy and sensitizes cells to oxidative stress suggesting also a compensatory mechanism (Massey, Kaushik, Sovak, Kiffin, & Cuervo, 2006).  $\alpha$ -Syn overexpression inhibits macroautophagy through blockade of autophagosome formation. However, cells expressing  $\alpha$ -syn in contact with preformed  $\alpha$ -syn aggregates leads to the formation of autophagosomes but their clearance is blocked (Tanik, Schultheiss, Volpicelli-Daley, Brunden, & Lee, 2013). In Atg7 knockout mice, macroautophagy impairment leads to ubiquitinated proteins,  $\alpha$ -syn and p62 increased (Ahmed et al., 2012). In another model of Atg7 knockout targeting TH-positive cells, accumulation of  $\alpha$ -syn in dopaminergic neurons, especially midbrain dopaminergic dendrites which exhibit numerous varicosities containing massive ubiquitinated inclusions, was identified (Friedman et al., 2012). Mechanistically,  $\alpha$ -syn compromises autophagy via Rab1a inhibition and causes mislocalization of the autophagy protein Atg9. Atg9 is implicated in the initiation of autophagosome formation (Winslow et al., 2010). Additional experiments are needed in order to decipher the molecular mechanisms implicated in macroautophagy in  $\alpha$ -syn toxicity.

While fewer studies have explored LRRK2 function in the UPS and ALP, LRRK2 contains several CMA-targeting motifs suggesting its possible degradation by CMA. The role of LRRK2 in CMA has been partially elucidated in a study from Orenstein in 2013. In this study, LRRK2 is degraded by CMA as knockdown of LAMP2a increases intracellular levels of LRRK2. Degradation of LRRK2 reaches 50% of normal levels in LAMP2a knockdowns whereas G2019S-LRRK2 is limited suggesting impairment of CMA through mutant LRRK2 activity (Orenstein et al., 2013). Degradation of LRRK2 through macroautophagy is supported through experiments in Atg5 KO and Atg7 KO mice showing accumulation of LRRK2 in cells and tissue (Friedman et al., 2012). Moreover, a fraction of LRRK2 is localized to membranes (Berger, Smith, & Lavoie, 2010; Biskup et al., 2006) and more specifically to autophagic vacuoles, amphisomes, and autolysosomes and lysosomes (Alegre-Abarrategui et al., 2009; Dodson, Zhang, Jiang, Chen, & Guo, 2012; Higashi et al., 2009; Orenstein et al., 2013). However, contradictory results were obtained on the role of LRRK2 in macroautophagy. On the one hand, several groups observe a positive regulation of autophagy by LRRK2. Saha and collaborators demonstrate that expression of human LRRK2 or dead kinase LRRK2 in *C. elegans* increases autophagy (Saha et al., 2015). In macrophages and microglial cells, LRRK2 knockdown significantly decreases the autophagic capacity (reduction of LC3 conversion), and LRRK2 inhibitors



**FIGURE 1** Cellular dysfunction and neurodegeneration through several distinct but nonmutually exclusive mechanisms. LRRK2 could have an impact on  $\alpha$ -syn release (gray numbers) as well as on its relocalization (black numbers) leading to a cell–cell transmission of the pathology and to an increase of the aggregation through an excess of  $\alpha$ -syn in the cytosolic pool (gray part). Three mechanisms seem to be impacted: the mitochondrial biology (blue part), the autophagic system (orange part), and the inflammation (violet part). Both LRRK2 and  $\alpha$ -syn are known to play a role in mitochondrial biology through Drp1 (blue number) in favor of a mitochondrial fragmentation leading to mitophagy and cell death. Inside the cell,  $\alpha$ -syn aggregates are mainly degraded by the autophagic–lysosomal pathway, which is one of the major protein breakdown systems (orange part). LRRK2 was found to decrease the activity of Rab7, which is implicated in the maturation of the autophagosome and thus blocking the degradation of the  $\alpha$ -syn aggregates. Outside the cell,  $\alpha$ -syn aggregates are captured by microglia to be degraded. One hypothesis is that LRRK2 could alter the machinery of phagocytosis leading to an accumulation of extracellular aggregates

(GSK2578215A or LRRK2-IN-1) block protein aggregate clearance (Schapansky, Nardozi, Felizia, & LaVoie, 2014). In 2010, Tong and collaborators showed that LRRK2 KO mice present accumulation of lipofuscin granules and p62 protein and a decrease of LC3-II conversion in renal tubule cells of aged mice (Tong et al., 2010), suggesting slowdown of autophagy in those cells. In flies, knockout of the LRRK2 ortholog dLRRK leads to an impairment of autophagy with enlarged early endosomes, accumulation of autophagosomes which involves a modulation of Rab9 activity (Dodson, Leung, Lone, Lizzio, & Guo, 2014). On the other hand, knockdown of LRRK2 by siRNA produces an induction of autophagy suggesting LRRK2 acts as a negative regulator of autophagy (Alegre-Abarrategui et al., 2009). In astrocytes, inhibition of LRRK2 stimulates macroautophagy in an mTor-independent

manner that requires Beclin (Manzoni et al., 2016). Bravo-San Pedro et collaborators observed an increase of autophagy induction (increase of LC3, LAMP2, Beclin1 and decrease p62) in G2019S-LRRK2 skin fibroblasts from PD patients via a MAPK/ERK-dependent pathway resulting in a highest sensitization to cell death (Bravo-San Pedro et al., 2013). As usual, the apparent discrepancies between these different studies may originate from different experimental conditions and cell types used, but as yet there is no clear consensus of LRRK2 effect on ALP.

To go deeper in our understanding of the possible link between  $\alpha$ -syn, LRRK2 and ALP, an interesting point is the role of Rab proteins and particularly Rab7. In fact, as mentioned above, Rab7 interacts with LRRK2 and plays a role in autophagosome and lysosome trafficking, positioning,

and fusion events. Rab7 promotes clearance of  $\alpha$ -syn aggregates (Dinter et al., 2016). Rab7 is also a key regulator of late endosome maturation and autophagosome–lysosome fusion (Jager, 2004). Therefore, it is conceivable that the link between LRRK2 and  $\alpha$ -syn in producing autophagy defects would be through Rab-dependent action, for example Rab7, at the membrane of autophagosomes. This modulation could interfere with trafficking of autophagosomes, which need to reach the soma to fuse with lysosomes to have an efficient autophagy.

## 5 | CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS

A compelling and growing body of evidence points toward a functional interaction between  $\alpha$ -syn and LRRK2. Intriguingly, in many studies, larger effects are observed by knocking down LRRK2 expression or activity compared to overexpressing mutated LRRK2, giving hope that LRRK2-targeting therapeutics may offer benefit to all PD patients rather than just those that have LRRK2 mutations. Yet, the underlying mechanisms that dictate LRRK2 and  $\alpha$ -syn interaction in PD are not clear. Based on our current understanding of both proteins in disease, cell autonomous and non-cell-autonomous pathways are likely relevant in linking the proteins together in pathogenesis and disease progression. When expressed in the same cell, in disease,  $\alpha$ -syn and LRRK2 likely interact in response to mitochondria disruption, in autophagy pathways in the endolysosomal system, as well as in normal interactions with common protein partners like 14-3-3 that maintain homeostasis of a number of systems. While  $\alpha$ -syn expression in the brain is highly restricted to neurons, LRRK2 is also expressed in the immune system, particularly in cells known to respond to amyloid forms of  $\alpha$ -syn, and LRRK2 appears to exacerbate damaging proinflammatory responses caused by  $\alpha$ -syn. Considering current knowledge, none of the mechanisms we discussed in this review appear to be more prominent than the others. These interactions will all take time and more advanced model systems and experiments to fully resolve. In the meantime, therapeutic targeting of both LRRK2 and  $\alpha$ -syn, if our understanding of these proteins in disease is at least partially correct, should provide the best opportunities to intervene in the disease process.

## ACKNOWLEDGMENTS

NC is a recipient of a PhD fellowship from Association France Parkinson (2016). CG is a recipient of the PhD fellowship from the French Ministry of Research. FG is funded by the European Union Horizon 2020 Programme

(H2020-MSCA-ITN-2015) under the Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network and Grant Agreement No. 676408. EB is supported by “Fondation de France, Parkinson committee” grants (AAP 2010, Engt 00016819 and AAP 2014, Engt 2014-0052580) and the national “Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences” (NeurATRIS, “Investissement d’Avenir”, ANR-11-INBS-0011). ABW is supported by NIH grants R01 NS064934, U01 NS097028, and R33 NS097643.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors of the present review declare to have no conflict of interest.

## AUTHORS’ CONTRIBUTIONS

N.C. wrote the first draft of the review with E.B. who focused on PD characteristics and pathogenesis. She also contributed to the drawing of Figure 1. C.G. LG. and M.-C. G. focused on the detailed autophagy and mitochondrial mechanisms potentially involved in PD and the synergy between  $\alpha$ -syn and LRRK2. F.G. edited the text and the figure. He took in charge on the management of references to double-check for scientific relevance. A.B.W. and E.B. supervised the writing of the manuscript and edited the text.

## ORCID

Emmanuel Brouillet  <http://orcid.org/0000-0001-6322-7403>

## REFERENCES

- Abdelmotilib, H., Maltbie, T., Delic, V., Liu, Z., Hu, X., Fraser, K. B., ... West, A. (2017).  $\alpha$ -Synuclein fibril-induced inclusion spread in rats and mice correlates with dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiology of Diseases*, *105*, 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.014>
- Adams, J. R., Van Netten, H., Schulzer, M., Mak, E., McKenzie, J., Strongosky, A., ... Stoessl, A. J. (2005). PET in LRRK2 mutations: Comparison to sporadic Parkinson’s disease and evidence for pre-symptomatic compensation. *Brain*, *128*, 2777–2785. <https://doi.org/10.1093/brain/awh607>
- Agarraberes, F. A., Terlecky, S. R., & Dice, J. F. (1997). An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *Journal of Cell Biology*, *137*, 825–834. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.825>
- Ahmed, I., Liang, Y., Schools, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Savitt, J. M. (2012). Development and characterization of a new Parkinson’s disease model resulting from impaired autophagy. *Journal of Neuroscience*, *32*, 16503–16509. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0209-12.2012>
- Alegre-Abarrategui, J., Christian, H., Lufino, M. M. P., Mutihac, R., Venda, L. L., Ansoorge, O., & Wade-Martins, R. (2009). LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane



- microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Human Molecular Genetics*, 18, 4022–4034. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp346>
- Alessi, D. R., & Sammler, E. (2018). LRRK2 kinase in Parkinson's disease. *Science*, 360, 36–37. <https://doi.org/10.1126/science.aar5683>
- Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M. C., Cooper, J. M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J. A., & Schapira, A. H. V. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of Neurology*, 67, 1464–1472. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>
- Ancolio, K., Alves Da Costa, C., Uéda, K., & Checler, F. (2000).  $\alpha$ -Synuclein and the Parkinson's disease-related mutant Ala53Thr- $\alpha$ -synuclein do not undergo proteasomal degradation in HEK293 and neuronal cells. *Neuroscience Letters*, 285, 79–82. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01049-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01049-1)
- Andres-Mateos, E., Mejias, R., Sasaki, M., Li, X., Lin, B. M., Biskup, S., ... Dawson, V. L. (2009). Unexpected lack of hypersensitivity in LRRK2 knock-out mice to MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). *Journal of Neuroscience*, 29, 15846–15850. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4357-09.2009>
- Anglade, P., Vyas, S., Hirsch, E. C., & Agid, Y. (1997). Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histology and Histopathology*, 12, 603–610.
- Barrett, J., Hansoul, S., Nicolae, D., & Cho, J. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40, 955–962. <https://doi.org/10.1038/ng.175>
- Bendor, J. T., Logan, T. P., & Edwards, R. H. (2013). The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, 79, 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>
- Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N., & Mouradian, M. M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 33855–33858. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33855>
- Benskey, M. J., Sellnow, R. C., Sandoval, I. M., Sortwell, C. E., Lipton, J. W., & Manfredsson, F. P. (2018). Silencing alpha synuclein in mature Nigral neurons results in rapid neuroinflammation and subsequent toxicity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00036>
- Berg, D., Holzmann, C., & Riess, O. (2003). 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 752–762. <https://doi.org/10.1038/nrn1197>
- Berger, Z., Smith, K. A., & Lavoie, M. J. (2010). Membrane localization of LRRK2 is associated with increased formation of the highly active LRRK2 dimer and changes in its phosphorylation. *Biochemistry*, 49, 5511–5523. <https://doi.org/10.1021/bi100157u>
- Biernacka, J. M., Armasu, S. M., Cunningham, J. M., Eric Ahlskog, J., Chung, S. J., & Maraganore, D. M. (2011). Do interactions between SNCA, MAPT, and LRRK2 genes contribute to Parkinson's disease susceptibility? *Parkinsonism & Related Disorders*, 17, 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.07.001>
- Biskup, S., Moore, D. J., Celsi, F., Higashi, S., West, A. B., Andrabi, S. A., ... Dawson, V. L. (2006). Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Annals of Neurology*, 60, 557–569. <https://doi.org/10.1002/ana.21019>
- Biskup, S., & West, A. B. (2009). Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 7, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2008.09.015>
- Bouhouche, A., Tibar, H., Haj, R. B. E., El Bayad, K., Razine, R., Tazrout, S., ... Regragui, W. (2017). LRRK2 G2019S mutation: Prevalence and clinical features in Moroccans with Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2017, 2412486.
- Botta-Orfila, T., Ezquerro, M., Pastor, P., Fernández-Santiago, R., Pont-Sunyer, C., Compta, Y., ... Tolosa, E. (2012). Age at onset in LRRK2-associated PD is modified by SNCA variants. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48, 245–247. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9820-7>
- Braak, H., & Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 247, II3–II10. <https://doi.org/10.1007/PL00007758>
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2004). Poor and protracted myelination as a contributory factor to neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Aging*, 25, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.04.001>
- Bravo-San Pedro, J. M., Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Pizarro-Estrella, E., Aiastui-Pujana, A., Gorostidi, A., ... González-Polo, R. A. (2013). The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 121–136. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1061-y>
- Buck, K., Landeck, N., Ulusoy, A., Majbour, N. K., El-Agnaf, O. M., & Kirik, D. (2015). Ser129 phosphorylation of endogenous  $\alpha$ -synuclein induced by overexpression of polo-like kinases 2 and 3 in nigral dopamine neurons is not detrimental to their survival and function. *Neurobiology of Diseases*, 78, 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.008>
- Busquets, M. A., Espargaró, A., Estelrich, J., & Sabate, R. (2015). Could  $\alpha$ -synuclein amyloid-like aggregates trigger a prionic neuronal invasion? *BioMed Research International*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/172018>
- Butler, E. K., Voigt, A., Lutz, A. K., Toegel, J. P., Gerhardt, E., Karsten, P., ... Schulz, J. B. (2012). The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-synuclein toxicity. *PLoS Genetics*, 8, e1002488. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002488>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabrieli, G., ... Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 17, 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Cacabelos, R. (2017). Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 551. <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Cali, T., Ottolini, D., Negro, A., & Brini, M. (2012).  $\alpha$ -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 17914–17929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302794>
- Cardo, L. F., Coto, E., De Mena, L., Ribacoba, R., Lorenzo-Betancor, O., Pastor, P., ... Alvarez, V. (2012). A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47, 425–430. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9669-1>
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., ... Destee, A. (2004).  $\alpha$ -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364, 1167–1169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
- Chen, L., Xie, Z., Turkson, S., & Zhuang, X. (2015). Neurobiol Dis A53T Human  $\alpha$ -Synuclein overexpression in transgenic mice induces pervasive mitochondria macroautophagy defects preceding dopamine neuron degeneration. *Journal of Neuroscience*, 35, 890–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0089-14.2015>

- Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A., & Andersen, J. K. (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience Letters*, *486*, 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.061>
- Choi, H. G., Zhang, J., Deng, X., Hatcher, J. M., Patricelli, M. P., Zhao, Z., ... Gray, N. S. (2012). Brain penetrant LRRK2 inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *3*, 658–662. <https://doi.org/10.1021/ml300123a>
- Civiero, L., Cogo, S., Kiekens, A., Morganti, C., Tessari, I., Lobbstaël, E., ... Greggio, E. (2017). PAK6 phosphorylates 14-3-3 $\gamma$  to regulate steady state phosphorylation of LRRK2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*, 417. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00417>
- Civiero, L., Vancraenenbroeck, R., Belluzzi, E., Beilina, A., Lobbstaël, E., Reyniers, L., ... Taymans, J. M. (2012). Biochemical characterization of highly purified leucine-rich repeat kinases 1 and 2 demonstrates formation of homodimers. *PLoS ONE*, *7*, e43472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043472>
- Clark, L. N., Wang, Y., Karlins, E., Saito, L., Mejia-Santana, H., Harris, J., ... Marder, K. (2006). Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease. *Neurology*, *67*, 1786–1791. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000244345.49809.36>
- Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., & de Bernard, M. (2013). Triggering of Inflammasome by aggregated  $\alpha$ -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS ONE*, *8*, e55375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055375>
- Cole, N. B., DiEuliis, D., Leo, P., Mitchell, D. C., & Nussbaum, R. L. (2008). Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Experimental Cell Research*, *314*, 2076–2089. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.03.012>
- Cookson, M. R. (2010). The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*, 791–797. <https://doi.org/10.1038/nrn2935>
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: In sickness and in health. *Trends in Cell Biology*, *14*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.12.002>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, *273*, 501–503. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>
- Cuervo, A. M., Dice, J. F., & Knecht, E. (1997). A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 5606–5615. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5606>
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, *305*, 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>
- Da Silveira, S. A., Schneider, B. L., Cifuentes-Diaz, C., Sage, D., Abbas-Terki, T., Iwatsubo, T., ... Aebischer, P. (2009). Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of  $\alpha$ -synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, *18*, 872–887. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn417>
- Daher, J. P. L., Abdelmotilib, H. A., Hu, X., Volpicelli-Daley, L. A., Moehle, M. S., Fraser, K. B., ... West, A. B. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) pharmacological inhibition abates  $\alpha$ -synuclein gene-induced neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, *290*, 19433–19444. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660001>
- Daher, J. P. L., Pletnikova, O., Biskup, S., Musso, A., Gellhaar, S., Galter, D., ... Moore, D. J. (2012). Neurodegenerative phenotypes in an A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mouse model are independent of LRRK2. *Human Molecular Genetics*, *21*, 2420–2431. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds057>
- Daher, J. P. L., Volpicelli-Daley, L. A., Blackburn, J. P., Moehle, M. S., & West, A. B. (2014). Abrogation of alpha-synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 9289–9294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403215111>
- Daniele, S. G., Béraud, D., Davenport, C., Cheng, K., Yin, H., & Maguire-Zeiss, K. A. (2015). Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded  $\alpha$ -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Science Signalling*, *8*, ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005965>
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.-C., Goodchild, R., Larsen, K. E., ... Hen, R. (2002). Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 14524–14529. <https://doi.org/10.1073/pnas.172514599>
- Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*, *66*, 646–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.034>
- Dehay, B., Bove, J., Rodriguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., & Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, *30*, 12535–12544. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010>
- Deng, X., Dzamko, N., Prescott, A., Davies, P., Liu, Q., Yang, Q., ... Gray, N. S. (2011). Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. *Nature Chemical Biology*, *7*, 203–205. <https://doi.org/10.1038/nchembio.538>
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., ... Lee, S.-J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*, 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of  $\alpha$ -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, *283*, 9089–9100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
- Devoto, V. M. P., Dimopoulos, N., Alloatti, M., Pardi, M. B., Saez, T. M., Otero, M. G., ... Falzone, T. L. (2017).  $\alpha$ -synuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease. *Scientific Reports*, *7*, 5042. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05334-9>
- Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., ... Greenamyre, J. T. (2016).  $\alpha$ -synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, *8*, 342.
- Dinter, E., Saridakis, T., Nippold, M., Plum, S., Diederichs, L., Komnig, D., ... Falkenburger, B. H. (2016). Rab7 induces clearance of  $\alpha$ -synuclein aggregates. *Journal of Neurochemistry*, *138*, 758–774. <https://doi.org/10.1111/jnc.13712>
- Dodson, M. W., Leung, L. K., Lone, M., Lizzio, M. A., & Guo, M. (2014). Novel ethyl methanesulfonate (EMS)-induced null alleles of the Drosophila homolog of LRRK2 reveal a crucial role in

- endolysosomal functions and autophagy in vivo. *Disease Models & Mechanisms*, 7, 1351–1363. <https://doi.org/10.1242/dmm.017020>
- Dodson, M. W., Zhang, T., Jiang, C., Chen, S., & Guo, M. (2012). Roles of the Drosophila LRRK2 homolog in Rab7-dependent lysosomal positioning. *Human Molecular Genetics*, 21, 1350–1363. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr573>
- Domert, J., Sackmann, C., Agholme, L., Bergström, J., Ingelsson, M., Hallbeck, M., & Severinsson, E. (2016). Aggregated alpha-synuclein transfer efficiently between cultured human neuron-like cells and localize to lysosomes. *PLoS ONE*, 11, e0168700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168700>
- Duffy, M. F., Collier, T. J., Patterson, J. R., Kemp, C. J., Luk, K. C., Tansey, M. G., ... Sortwell, C. E. (2018). Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1171-z>
- Dzanko, N., Deak, M., Hentati, F., Reith, A. D., Prescott, A. R., Alessi, D. R., & Nichols, R. J. (2010). Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser 910/Ser 935, disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochemical Journal*, 430, 405–413. <https://doi.org/10.1042/BJ20100784>
- Ellis, C. E., Murphy, E. J., Mitchell, D. C., Golovko, M. Y., Scaglia, F., Gwendolyn, C., ... Barcelo, G. C. (2005). Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 10190–10201. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10190-10201.2005>
- Engelender, S., & Isacson, O. (2017). The threshold theory for Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 40, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.10.008>
- Estrada, A. A., Chan, B. K., Baker-Glenn, C., Beresford, A., Burdick, D. J., Chambers, M., ... Sweeney, Z. K. (2014). Discovery of highly potent, selective, and brain-penetrant aminopyrazole Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) small molecule inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 921–936. <https://doi.org/10.1021/jm401654j>
- Erustes, A. G., Stefani, F. Y., Terashima, J. Y., Stilhano, R. S., Monteforte, P. T., da Silva Pereira, G. J., ... Smaili, S. S. (2018). Overexpression of alpha-synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, 96(1), 160–171. <https://doi.org/10.1002/jnr.24092>
- Fred Dice, J. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 305–309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8)
- Friedman, L. G., Lachenmayer, M. L., Wang, J., He, L., Poulouse, S. M., Komatsu, M., ... Yue, Z. (2012). Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of alpha-synuclein and LRRK2 in the brain. *Journal of Neuroscience*, 32, 7585–7593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5809-11.2012>
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., & Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Annals of Neurology*, 51, 296–301. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1531-8249](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1531-8249)
- Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B. E., Ballester, I., Stevens, C., ... Podolsky, D. K. (2010). LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *The Journal of Immunology*, 185, 5577–5585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000548>
- Gelders, G., Baekelandt, V., & Van Der Perren, A. (2018). Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of Immunology Research*, 2018, 4784268.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 34, 521–533. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00682-7)
- Gibb, W. R. G., Scott, T., & Lees, A. J. (1991). Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 6, 2–11. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1531-8257](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1531-8257)
- Gilks, W. P., Abou-Sleiman, P. M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A. J., ... Wood, N. W. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 415–416. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17830-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17830-1)
- Gillardon, F., Schmid, R., & Draheim, H. (2012). Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity. *Neuroscience*, 208, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.001>
- Gloeckner, C. J., Boldt, K., Von Zweyendorf, F., Helm, S., Wiesent, L., Sarioglu, H., & Ueffing, M. (2010). Phosphopeptide analysis reveals two discrete clusters of phosphorylation in the N-terminus and the Roc domain of the Parkinson-disease associated protein kinase LRRK2. *Journal of Proteome Research*, 9, 1738–1745. <https://doi.org/10.1021/pr9008578>
- Goldwurm, S., Zini, M., Di Fonzo, A., De Gaspari, D., Siri, C., Simons, E. J., ... Pezzoli, G. (2006). LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: A clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Italian sample. *Parkinsonism & Related Disorders*, 12, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2006.04.001>
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Nash, K., Gorbatyuk, M., Lewin, A. S., Sullivan, L. F., ... Muzyczka, N. (2010). In vivo RNAi-mediated alpha-synuclein silencing induces nigrostriatal degeneration. *Molecular Therapy*, 18, 1450–1457. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.115>
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Sullivan, L. F., Chen, W., Kondrikova, G., Manfredsson, F. P., ... Muzyczka, N. (2008). The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 763–768. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711053105>
- Grassi, D., Howard, S., Zhou, M., Diaz-Perez, N., Urban, N. T., Guerrero-Given, D., ... Lasmézas, C. I. (2018). Identification of a highly neurotoxic alpha-synuclein species inducing mitochondrial damage and mitophagy in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E2634–E2643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713849115>
- Greggio, E., Jain, S., Kingsbury, A., Bandopadhyay, R., Lewis, P., Kaganovich, A., ... Cookson, M. R. (2006). Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiology of Diseases*, 23, 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.04.001>
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., ... Przedborski, S. (2014). alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *Journal of Neuroscience*, 34, 249–259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014>
- Gustot, A., Gallea, J. I., Sarroukh, R., Celej, M. S., Ruyschaert, J.-M., & Raussens, V. (2015). Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease. *Biochemical Journal*, 471, 323–333. <https://doi.org/10.1042/BJ20150617>



- Hakimi, M., Selvanantham, T., Swinton, E., Padmore, R. F., Tong, Y., Kabbach, G., ... Schlossmacher, M. G. (2011). Parkinson's disease-linked LRRK2 is expressed in circulating and tissue immune cells and upregulated following recognition of microbial structures. *Journal of Neural Transmission*, *118*, 795–808. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0653-2>
- Hasegawa, K., Stoessl, A. J., Yokoyama, T., Kowa, H., Wszolek, Z. K., & Yagishita, S. (2009). Familial parkinsonism: Study of original Sagami-hara PARK8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes. *Parkinsonism & Related Disorders*, *15*, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.07.010>
- Healy, D. G., Falchi, M., O'Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., ... Wood, N. W. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: A case-control study. *The Lancet Neurology*, *7*, 583–590. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70117-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70117-0)
- Herzig, M. C., Bidinosti, M., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmelen, C., Weiss, A., ... Shimshek, D. R. (2012). High LRRK2 levels fail to induce or exacerbate neuronal alpha-synucleinopathy in mouse brain. *PLoS ONE*, *7*, e36581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036581>
- Higashi, S., Moore, D. J., Yamamoto, R., Minegishi, M., Sato, K., Togo, T., ... Iseki, E. (2009). Abnormal localization of leucine-rich repeat kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in lewy body disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *68*, 994–1005. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b44ed8>
- Huang, Y., Halliday, G. M., Vandebona, H., Mellick, G. D., Mastaglia, F., Stevens, J., ... Sue, C. M. (2007). Prevalence and clinical features of common LRRK2 mutations in Australians with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *22*, 982–989. <https://doi.org/10.1002/mds.21477>
- Hulihan, M. M., Ishihara-Paul, L., Kachergus, J., Warren, L., Amouri, R., Elango, R., ... Farrer, M. J. (2008). LRRK2 Gly2019Ser penetrance in Arab-Berber patients from Tunisia: A case-control genetic study. *The Lancet Neurology*, *7*, 591–594. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70116-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70116-9)
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debré, P., ... Hirsch, E. C. (1999). FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *Journal of Neuroscience*, *19*, 3440–3447. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-09-03440.1999>
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., & Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathologica*, *106*, 518–526. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0766-2>
- Inglis, K. J., Chereau, D., Brigham, E. F., Chiou, S. S., Schöbel, S., Frigon, N. L., ... Anderson, J. P. (2009). Polo-like kinase 2 (PLK2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, *284*, 2598–2602. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800206200>
- Ishii, A., Nonaka, T., Taniguchi, S., Saito, T., Arai, T., Mann, D., ... Hasegawa, M. (2007). Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS Letters*, *581*, 4711–4717. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.067>
- Jager, S. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, *117*, 4837–4848. <https://doi.org/10.1242/jcs.01370>
- Kachergus, J., Mata, I. F., Hulihan, M., Taylor, J. P., Lincoln, S., Aasly, J., ... Toft, M. (2005). Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: Evidence of a common founder across European populations. *American Journal of Human Genetics*, *76*, 672–680. <https://doi.org/10.1086/429256>
- Kalia, L. V., Lang, A. E., Hazrati, L. N., Fujioka, S., Wszolek, Z. K., Dickson, D. W., ... Marras, C. (2015). Clinical correlations with lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease. *JAMA Neurology*, *72*, 100–105. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2704>
- Kamikawaji, S., Ito, G., & Iwatsubo, T. (2009). Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2. *Biochemistry*, *48*, 10963–10975. <https://doi.org/10.1021/bi9011379>
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., ... Haass, C. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO Journal*, *29*, 3571–3589. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.223>
- Karuppagounder, S. S., Xiong, Y., Lee, Y., Lawless, M. C., Kim, D., Nordquist, E., ... Dawson, V. L. (2015). LRRK2 G2019S transgenic mice display increased susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-mediated neurotoxicity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *2*, 4–11.
- Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., Honjyo, Y., Shibasaki, H., & Budka, H. (2002). 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *61*, 245–253. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.3.245>
- Khan, N. L., Jain, S., Lynch, J. M., Pavese, N., Abou-Sleiman, P., Holton, J. L., ... Wood, N. W. (2005). Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: Clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain*, *128*, 2786–2796. <https://doi.org/10.1093/brain/awh667>
- Khodr, C. E., Pedapati, J., Han, Y., & Bohn, M. C. (2012). Inclusion of a portion of the native SNCA 3'UTR reduces toxicity of human S129A SNCA on striatal-projecting dopamine neurons in rat substantia nigra. *Developmental Neurobiology*, *72*, 906–917. <https://doi.org/10.1002/dneu.20989>
- Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., ... Lee, S. J. (2013). Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nature Communications*, *4*, 1562. <https://doi.org/10.1038/ncomms2534>
- Kim, B., Yang, M. S., Choi, D., Kim, J. H., Kim, H. S., Seol, W., ... Joe, E. H. (2012). Impaired inflammatory responses in murine lrrk2-knockdown brain microglia. *PLoS ONE*, *7*, e34693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034693>
- Klivenyi, P., Siwek, D., Gardian, G., Yang, L., Starkov, A., Cleren, C., ... Beal, M. F. (2006). Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiology of Diseases*, *21*, 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.08.018>
- Kondo, K., Obitsu, S., & Teshima, R. (2011). alpha-Synuclein aggregation and transmission are enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *34*, 1078–1083.
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, *14*, 504–506. <https://doi.org/10.1038/nm1747>
- Kozina, E., Shankar, S., Yun, J., Yuchen, D., Zhijun, M., Haiyan, T., ... Richard, J. S. (2018). Mutant LRRK2 mediates peripheral and

- central immune responses leading to neurodegeneration in vivo. *Brain*, *141*, 1753–1769. <https://doi.org/10.1093/brain/awy077>
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., ... Riess, O. (1998). AlaSOPro mutation in the gene encoding  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, *18*, 106–108. <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>
- Langston, J. W., & Ballard, P. A. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *New England Journal of Medicine*, *309*, 310.
- Lastres-Becker, I., Ulusoy, A., Innamorato, N. G., Sahin, G., Rábano, A., Kirik, D., & Cuadrado, A. (2012).  $\alpha$ -synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, *21*, 3173–3192. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5143>
- Lavalley, N. J., Slone, S. R., Ding, H., West, A. B., & Yacoubian, T. A. (2016). 14-3-3 Proteins regulate mutant LRRK2 kinase activity and neurite shortening. *Human Molecular Genetics*, *25*, 109–122. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv453>
- Lee, J.-W., & Cannon, J. R. (2015). LRRK2 mutations and neurotoxicant susceptibility. *Experimental Biology and Medicine*, *240*, 752–759. <https://doi.org/10.1177/1535370215579162>
- Lee, H.-J., Khoshaghideh, F., Patel, S., & Lee, S.-J. (2004). Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *Journal of Neuroscience*, *24*, 1888–1896. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3809-03.2004>
- Lee, B. D., Shin, J. H., Vankampen, J., Petrucelli, L., West, A. B., Ko, H. S., ... Dawson, T. M. (2010). Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, *16*, 998–1000. <https://doi.org/10.1038/nm.2199>
- Lee, M. K., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, A. S., ... Price, D. L. (2002). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 Thr mutation causes neurodegenerative disease with  $\alpha$ -synuclein aggregation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 8968–8973. <https://doi.org/10.1073/pnas.132197599>
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, *6*, 463–477. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00099-1)
- Li, W.-W., Yang, R., Guo, J.-C., Ren, H.-M., Zha, X.-L., Cheng, J.-S., & Cai, D.-F. (2007). Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *NeuroReport*, *18*, 1543–1546. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282f03db4>
- Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., McAuliffe, W. G., ... Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Medicine*, *5*, 1403–1409. <https://doi.org/10.1038/70978>
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*, 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lin, X., Parisiadou, L., Gu, X. L., Wang, L., Shim, H., Sun, L., ... Cai, H. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's disease-related mutant  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, *64*, 807–827. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.006>
- Lin, C. H., Tzen, K. Y., Yu, C. Y., Tai, C. H., Farrer, M. J., & Wu, R. M. (2008). LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease in a Taiwanese population: Clinical, PET, and functional studies. *Journal of Biomedical Science*, *15*, 661–667. <https://doi.org/10.1007/s11373-008-9260-0>
- Lindström, V., Gustafsson, G., Sanders, L. H., Howlett, E. H., Sigvardson, J., Kasrayan, A., ... Erlandsson, A. (2017). Extensive uptake of  $\alpha$ -synuclein oligomers in astrocytes results in sustained intracellular deposits and mitochondrial damage. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *82*, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.04.009>
- Liu, Z., Hamamichi, S., Lee, B. D., Yang, D., Ray, A., Caldwell, G. A., ... Dawson, V. L. (2011). Inhibitors of LRRK2 kinase attenuate neurodegeneration and Parkinson-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Parkinson's disease models. *Human Molecular Genetics*, *20*, 3933–3942. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr312>
- Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., ... Yu, S. (2009).  $\alpha$ -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience Letters*, *454*, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.056>
- Loeb, V., Yakunin, E., Saada, A., & Sharon, R. (2010). The transgenic overexpression of  $\alpha$ -synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 7334–7343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061051>
- Loeffler, D. A., Klaver, A. C., Coffey, M. P., Aasly, J. O., & LeWitt, P. A. (2017). Increased oxidative stress markers in cerebrospinal fluid from healthy subjects with Parkinson's disease-associated LRRK2 gene mutations. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 89. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00089>
- Longo, F., Mercatelli, D., Novello, S., Arcuri, L., Brugnoli, A., Vincenzi, F., ... Morari, M. (2017). Age-dependent dopamine transporter dysfunction and Serine129 phospho- $\alpha$ -synuclein overload in G2019S LRRK2 mice. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*, 22. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0426-8>
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*, 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Ma, B., Xu, L., Pan, X., Sun, L., Ding, J., Xie, C., ... Cai, H. (2015). LRRK2 modulates microglial activity through regulation of chemokine (C-X3-C) receptor 1-mediated signalling pathways. *Human Molecular Genetics*, *25*, 3515–3523.
- Maatouk, L., Yi, C., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Compagnion, A.-C., Hunot, S., Ezan, P., ... Vyas, S. (2018). Glucocorticoid receptor in astrocytes regulates midbrain dopamine neurodegeneration through connexin hemichannel activity. *Cell Death and Differentiation*, *9*(1), 3109. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05680-w>
- Maekawa, T., Sasaoka, T., Azuma, S., Ichikawa, T., Melrose, H. L., Farrer, M. J., & Obata, F. (2016). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) regulates  $\alpha$ -synuclein clearance in microglia. *BMC Neuroscience*, *17*, 77. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0315-2>
- Majeski, A. E., & Fred Dice, J. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*, 2435–2444. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.013>
- Mamais, A., Chia, R., Beilina, A., Hauser, D. N., Hall, C., Lewis, P. A., ... Bandopadhyay, R. (2014). Arsenite stress down-regulates phosphorylation and 14-3-3 binding of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), promoting self-association and cellular redistribution.



- Journal of Biological Chemistry*, 289, 21386–21400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528463>
- Manfredsson, F. P., Luk, K. C., Benskey, M. J., Gezer, A., Garcia, J., Kuhn, N. C., ... Kordower, J. H. (2018). Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology. *Neurobiology of Diseases*, 112, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.01.008>
- Manzoni, C., Mamais, A., Roosen, D. A., Dihanich, S., Soutar, M. P. M., Plun-Favreau, H., ... Lewis, P. A. (2016). MTOR independent regulation of macroautophagy by leucine rich repeat kinase 2 via Beclin-1. *Scientific Reports*, 6, 35106. <https://doi.org/10.1038/srep35106>
- Marcinek, P., Jha, A. N., Shinde, V., Sundaramoorthy, A., Rajkumar, R., Suryadevara, N. C., ... Velavan, T. P. (2013). LRRK2 and RIPK2 variants in the NOD 2-mediated signaling pathway are associated with susceptibility to *Mycobacterium leprae* in Indian populations. *PLoS ONE*, 8, e73103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073103>
- Martin, L. J., Pan, Y., Price, A. C., Sterling, W., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., ... Lee, M. K. (2006). Parkinson's disease  $\alpha$ -synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *Journal of Neuroscience*, 26, 41–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4308-05.2006>
- Martinez, J. H., Alaimo, A., Gorjod, R. M., Porte Alcon, S., Fuentes, F., Coluccio Leskow, F., & Kotler, M. L. (2018). Drp-1 dependent mitochondrial fragmentation and protective autophagy in dopaminergic SH-SY5Y cells overexpressing alpha-synuclein. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 88, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.01.004>
- Massey, A. C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., & Cuervo, A. M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 5805–5810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507436103>
- Massey, A., Kiffin, R., & Cuervo, A. M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 2420–2434. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.010>
- Mata, I. F., Wedemeyer, W. J., Farrer, M. J., Taylor, J. P., & Gallo, K. A. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease: Protein domains and functional insights. *Trends in Neurosciences*, 29, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.03.006>
- McGeer, P. L., Itagaki, S., & McGeer, E. G. (1988). Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathologica*, 76, 550–557. <https://doi.org/10.1007/BF00689592>
- McNaught, K. S. P., Mytilin, C., JnoBaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *Journal of Neurochemistry*, 81, 301–306. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00821.x>
- Melo, T. Q., van Zomeran, K. C., Ferrari, M. F. R., Boddeke, H. W. G. M., & Copray, J. C. V. M. (2016). Impairment of mitochondria dynamics by human A53T  $\alpha$ -synuclein and rescue by NAP (davunetide) in a cell model for Parkinson's disease. *Experimental Brain Research*, 235, 731–742. <https://doi.org/10.1007/s00221-016-4836-9>
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., ... Kagawa, Y. (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163, 1450–1455. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91141-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91141-8)
- Moehle, M. S., Webber, P. J., Tse, T., Sukar, N., Standaert, D. G., DeSilva, T. M., ... West, A. B. (2012). LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *Journal of Neuroscience*, 32, 1602–1611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5601-11.2012>
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- $\alpha$  levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 211, 13–16. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12706-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12706-3)
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., & Nagatsu, T. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 165, 208–210. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90746-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90746-3)
- Mortiboys, H., Furnston, R., Bronstad, G., Aasly, J., Elliott, C., & Bandmann, O. (2015). UDCA exerts beneficial effect on mitochondrial dysfunction in LRRK2 G2019S carriers and in vivo. *Neurology*, 85, 846–852. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001905>
- Mortiboys, H., Johansen, K. K., Aasly, J. O., & Bandmann, O. (2010). Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. *Neurology*, 75, 2017–2020. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ff9685>
- Mougenot, A. L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., ... Baron, T. (2012). Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Aging*, 33, 2225–2228. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022>
- Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., & Mayer, A. (2000). Autophagic tubes: Vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *Journal of Cell Biology*, 151, 519–528. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.519>
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., ... Edwards, R. H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 20710–20726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213538>
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Wallender, E. K., Kaehlecke, K., Ott, M., & Edwards, R. H. (2008). Optical reporters for the conformation of alpha-synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *Journal of Neuroscience*, 28, 12305–12317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3088-08.2008>
- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., ... Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 46, 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>
- Ng, C.-H., Mok, S. Z. S., Koh, C., Ouyang, X., Fivaz, M. L., Tan, E.-K., ... Lim, K.-L. (2009). Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, 29, 11257–11262. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2375-09.2009>
- Nichols, R. J., Dzamko, N., Morrice, N. A., Campbell, D. G., Deak, M., Ordureau, A., ... Alessi, D. R. (2010). 14-3-3 binding to LRRK2

- is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochemical Journal*, *430*, 393–404. <https://doi.org/10.1042/BJ20100483>
- Nichols, W. C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Halter, C. A., ... Foroud, T. (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet*, *365*, 410–412.
- Niu, J., Yu, M., Wang, C., & Xu, Z. (2012). Leucine-rich repeat kinase 2 disturbs mitochondrial dynamics via dynamin-like protein. *Journal of Neurochemistry*, *122*, 650–658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07809.x>
- Oosterveld, L. P., Allen, J. C., Ng, E. Y. L., Seah, S. H., Tay, K. Y., Au, W. L., ... Tan, L. C. S. (2015). Greater motor progression in patients with Parkinson disease who carry LRRK2 risk variants. *Neurology*, *85*, 1039–1042. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001953>
- Orenstein, S. J., Kuo, S. H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., ... Cuervo, A. M. (2013). Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nature Neuroscience*, *16*, 394–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3350>
- Oueslati, A., Schneider, B. L., Aebischer, P., & Lashuel, H. A. (2013). Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic alpha-synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, E3945–E3954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309991110>
- Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., Van Der Brug, M., ... Singleton, A. B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, *44*, 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.023>
- Papkovskaia, T. D., Chau, K. Y., Inesta-vaquera, F., Papkovsky, D. B., Healy, D. G., Nishio, K., ... Cooper, J. M. (2012). G2019s leucine-rich repeat kinase 2 causes uncoupling protein-mediated mitochondrial depolarization. *Human Molecular Genetics*, *21*, 4201–4213. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds244>
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2008). Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*, 1272–1284. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7589-1>
- Paumier, K. L., Luk, K. C., Manfredsson, F. P., Kanaan, N. M., Lipton, J. W., Collier, T. J., ... Sortwell, C. E. (2015). Intrastriatal injection of pre-formed mouse alpha-synuclein fibrils into rats triggers alpha-synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiology of Diseases*, *82*, 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.003>
- Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B. I., Norris, E. H., Rueter, S. M., ... Ischiropoulos, H. (2001). Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *Journal of Neuroscience*, *21*, 8053–8061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08053.2001>
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van Der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., ... Baekelandt, V. (2015). alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*, *522*, 340–344. <https://doi.org/10.1038/nature14547>
- Petroi, D., Popova, B., Taheri-Talesh, N., Irniger, S., Shahpasandzadeh, H., Zweckstetter, M., ... Braus, G. H. (2012). Aggregate clearance of alpha-synuclein in *Saccharomyces cerevisiae* depends more on autophagosome and vacuole function than on the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, *287*, 27567–27579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361865>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., ... Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*, 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Post, M. R., Lieberman, O. J., & Mosharov, E. V. (2018). Can interactions between alpha-synuclein, dopamine and calcium explain selective neurodegeneration in Parkinson's disease? *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 1–11.
- Pronin, a. N., Morris, a. J., Surguchov, a., & Benovic, J. L. (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *Journal of Biological Chemistry*, *275*, 26515–26522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003542200>
- Puccini, J. M., Marker, D. F., Fitzgerald, T., Barbieri, J., Kim, C. S., Miller-Rhodes, P., ... Gelbard, H. A. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2 modulates neuroinflammation and neurotoxicity in models of human immunodeficiency virus 1-associated neurocognitive disorders. *Journal of Neuroscience*, *35*, 5271–5283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0650-14.2015>
- Ramonet, D., Daher, J. P. L., Lin, B. M., Stafa, K., Kim, J., Banerjee, R., ... Moore, D. J. (2011). Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS ONE*, *6*, 13–19.
- Recasens, A., & Dehay, B. (2014). Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 159.
- Reeve, A. K., Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Simcox, E. M., Horrocks, M. H., Klenerman, D., ... Abramov, A. Y. (2015). Aggregated alpha-synuclein and complex I deficiency: Exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death & Disease*, *6*, e1820. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.166>
- Rideout, H. J., Larsen, K. E., Sulzer, D., & Stefanis, L. (2001). Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, *78*, 899–908. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00474.x>
- Rideout, H. J., & Stefanis, L. (2002). Proteasomal inhibition-induced inclusion formation and death in cortical neurons require transcription and ubiquitination. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *21*, 223–238. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1173>
- Ross, O. A., Soto-Ortolaza, A. I., Heckman, M. G., Aasly, J. O., Abahuni, N., Annesi, G., ... Farrer, M. J. (2011). Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: A case-control study. *The Lancet Neurology*, *10*, 898–908. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70175-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70175-2)
- Rudenko, I. N., & Cookson, M. R. (2010). 14-3-3 proteins are promising LRRK2 interactors. *Biochemical Journal*, *430*, e5–e6. <https://doi.org/10.1042/BJ20101200>
- Russo, I., Berti, G., Plotegher, N., Bernardo, G., Filograna, R., Bubacco, L., & Greggio, E. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down-regulates NF-κB p50 signaling in cultured microglia cells. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 1–13.
- Ryan, T., Bamm, V. V., Stykel, M. G., Coackley, C. L., Humphries, K. M., Jamieson-Williams, R., ... Ryan, S. D. (2018). Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates alpha-synuclein. *Nature Communications*, *9*, 817. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03241-9>
- Saez-Atienzar, S., Bonet-Ponce, L., Blesa, J. R., Romero, F. J., Murphy, M. P., Jordan, J., & Galindo, M. F. (2014). The LRRK2 inhibitor GSK2578215A induces protective autophagy in SH-SY5Y cells: Involvement of Drp-1-mediated mitochondrial fission and

- mitochondrial-derived ROS signaling. *Cell Death & Disease*, 5, e1368. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.320>
- Saha, S., Ash, P. E. a., Gowda, V., Liu, L., Shirihai, O., & Wolozin, B. (2015). Mutations in LRRK2 potentiate age-related impairment of autophagic flux. *Molecular Neurodegeneration*, 10, 26. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0022-y>
- Saha, S., Guillily, M. D., Ferree, A., Lanceta, J., Chan, D., Ghosh, J., ... Wolozin, B. (2009). LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 29, 9210–9218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2281-09.2009>
- Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N. N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., ... Murayama, S. (2003). Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62, 644–654. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.6.644>
- Sarafian, T. A., Ryan, C. M., Souda, P., Masliah, E., Kar, U. K., Vinters, H. V., ... Watson, J. B. (2013). Impairment of mitochondria in adult mouse brain overexpressing predominantly full-length, N-terminally acetylated human alpha-synuclein. *PLoS ONE*, 8, e63557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063557>
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., ... Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 41, 1303–1307. <https://doi.org/10.1038/ng.485>
- Sato, H., Arawaka, S., Hara, S., Fukushima, S., Koga, K., Koyama, S., & Kato, T. (2011). Authentically phosphorylated alpha-synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 31, 16884–16894. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-11.2011>
- Schapansky, J., Khasnavis, S., DeAndrade, M. P., Nardozi, J. D., Falkson, S. R., Boyd, J. D., ... LaVoie, M. J. (2018). Familial knockin mutation of LRRK2 causes lysosomal dysfunction and accumulation of endogenous insoluble alpha-synuclein in neurons. *Neurobiology of Diseases*, 111, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.005>
- Schapansky, J., Nardozi, J. D., Felizia, F., & LaVoie, M. J. (2014). Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy. *Human Molecular Genetics*, 23, 4201–4214. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu138>
- Schapira, A. H. (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7, 97–109. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70327-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70327-7)
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54, 823–827. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>
- Sheng, Z., Zhang, S., Bustos, D., Kleinheinz, T., Le Pichon, C. E., Dominguez, S. L., ... Zhu, H. (2012). Ser1292 autophosphorylation is an indicator of LRRK2 kinase activity and contributes to the cellular effects of PD mutations. *Science Translational Medicine*, 4, 164ra161.
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science*, 306, 990–995. <https://doi.org/10.1126/science.1099993>
- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., ... Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 41, 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., ... Gwinn-Hardy, K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302, 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>
- Skaper, S. D., Facci, L., Zusso, M., & Giusti, P. (2018). An inflammation-centric view of neurological disease: Beyond the neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 1–26.
- Skibinski, G., Nakamura, K., Cookson, M. R., & Finkbeiner, S. (2014). Mutant LRRK2 toxicity in neurons depends on LRRK2 levels and synuclein but not kinase activity or inclusion bodies. *Journal of Neuroscience*, 34, 418–433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2712-13.2014>
- Slone, S. R., Lavalley, N., McFerrin, M., Wang, B., & Yacoubian, T. A. (2015). Increased 14-3-3 phosphorylation observed in Parkinson's disease reduces neuroprotective potential of 14-3-3 proteins. *Neurobiology of Diseases*, 79, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.032>
- Smith, W. W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (2006). Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature Neuroscience*, 9, 1231–1233. <https://doi.org/10.1038/nn1776>
- Song, D. D., Shults, C. W., Sisk, A., Rockenstein, E., & Masliah, E. (2004). Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Experimental Neurology*, 186, 158–172. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00342-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00342-X)
- Stichel, C. C., Zhu, X. R., Bader, V., Linnartz, B., Schmidt, S., & Lübbert, H. (2007). Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Human Molecular Genetics*, 16, 2377–2393. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm083>
- Su, Y. C., & Qi, X. (2013). Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. *Human Molecular Genetics*, 22, 4545–4561. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt301>
- Subramaniam, S. R., Vergnes, L., Franich, N. R., Reue, K., & Chesselet, M. F. (2014). Region specific mitochondrial impairment in mice with widespread overexpression of alpha-synuclein. *Neurobiology of Diseases*, 70, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.017>
- Sun, Q., Wang, T., Jiang, T., Huang, P., Li, D., Wang, Y., ... Chen, S. (2016). Effect of a leucine-rich repeat kinase 2 variant on motor and non-motor symptoms in Chinese Parkinson's disease patients. *Aging and Disease*, 7, 230–236. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.1026>
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A., & Halliday, G. M. (2017a). Parkinson's disease is not simply a prion disorder. *Journal of Neuroscience*, 37, 9799–9807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1787-16.2017>
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A., & Halliday, G. M. (2017b). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18, 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178>
- Tan, E. K., Shen, H., Tan, L. C. S., Farrer, M., Yew, K., Chua, E., ... Liu, J. J. (2005). The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 384, 327–329. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.103>
- Tan, E. K., Zhao, Y., Tan, L., Lim, H. Q., Lee, J., Yuen, Y., ... Liu, J. J. (2007). Analysis of LRRK2 Gly2385Arg genetic variant in non-Chinese Asians. *Movement Disorders*, 22, 1816–1818. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1531-8257](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1531-8257)



- Tanik, S. A., Schultheiss, C. E., Volpicelli-Daley, L. A., Brunden, K. R., & Lee, V. M. Y. (2013). Lewy body-like alpha-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 15194–15210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457408>
- Tarasova, T. V., Lytkina, O. A., Goloborshcheva, V. V., Skuratovskaya, L. N., Antohin, A. I., Ovchinnikov, R. K., & Kukharsky, M. S. (2018). Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain. *PeerJ*, *6*, e4779. <https://doi.org/10.7717/peerj.4779>
- Taymans, J.-M., & Greggio, E. (2016). LRRK2 kinase inhibition as a therapeutic strategy for Parkinson's disease, where do we stand? *Current Neuropharmacology*, *14*, 214–225. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666151030102847>
- Thévenet, J., Gobert, R., van Huijsduijnen, R. H., Wiessner, C., & Sagot, Y. J. (2011). Regulation of LRRK2 expression points to a functional role in human monocyte maturation. *PLoS ONE*, *6*, e21519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021519>
- Tofaris, G. K., Layfield, R., & Spillantini, M. G. (2001).  $\alpha$ -Synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Letters*, *509*, 22–26. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03115-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03115-5)
- Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime, E., Boyle, S., Kopan, R., Kelleher, R. J., & Shen, J. (2010). Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of  $\alpha$ -synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 9879–9884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004676107>
- Trabzuni, D., Ryten, M., Emmett, W., Ramasamy, A., Lackner, K. J., Zeller, T., ... Plagnol, V. (2013). Fine-mapping, gene expression and splicing analysis of the disease associated LRRK2 locus. *PLoS ONE*, *8*, e70724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070724>
- Trinh, J., Amouri, R., Duda, J. E., Morley, J. F., Read, M., Donald, A., ... Farrer, M. J. (2014). A comparative study of Parkinson's disease and leucine-rich repeat kinase 2 p.G2019S parkinsonism. *Neurobiology of Aging*, *35*, 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.015>
- Van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., ... Bilbe, G. (2000). Neuropathology in mice expressing human  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Neuroscience*, *20*, 6021–6029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06021.2000>
- Venderova, K., Kabbach, G., Abdel-Messih, E., Zhang, Y., Parks, R. J., Imai, Y., ... Park, D. S. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 interacts with Parkin, DJ-1 and PINK-1 in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, *18*, 4390–4404. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp394>
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., & Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*, 23542–23556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801992200>
- Volpicelli-Daley, L. A., Abdelmotilib, H., Liu, Z., Stoyka, L., Daher, J. P. L., Milnerwood, A. J., ... West, A. B. (2016). G2019S-LRRK2 expression augments  $\alpha$ -synuclein sequestration into inclusions in neurons. *Journal of Neuroscience*, *36*, 7415–7427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3642-15.2016>
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., ... Lee, V. M. Y. (2011). Exogenous  $\alpha$ -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron*, *72*, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033>
- Walker, M. D., Volta, M., Cataldi, S., Dinelle, K., Beccano-Kelly, D., Munsie, L., ... Sossi, V. (2014). Behavioral deficits and striatal DA signaling in LRRK2 p.G2019S transgenic rats: A multimodal investigation including PET neuroimaging. *Journal of Parkinson's Disease*, *4*, 483–498. <https://doi.org/10.3233/JPD-140344>
- Wang, D., Xu, L., Lv, L., Su, L. Y., Fan, Y., Zhang, D. F., ... Yao, Y. G. (2015). Association of the LRRK2 genetic polymorphisms with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Genes and Immunity*, *16*, 112–119. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.72>
- Wang, X., Yan, M. H., Fujioka, H., Liu, J., Wilson-delfosse, A., Chen, S. G., ... Zhu, X. (2012). LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Human Molecular Genetics*, *21*, 1931–1944. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds003>
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003).  $\alpha$ -synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 25009–25013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
- Webber, P. J., Smith, A. D., Sen, S., Renfrow, M. B., Mobley, J. A., & West, A. B. (2011). Autophosphorylation in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) GTPase domain modifies kinase and GTP-binding activities. *Journal of Molecular Biology*, *412*, 94–110. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.033>
- West, A. B. (2015). Ten years and counting: Moving leucine-rich repeat kinase 2 inhibitors to the clinic. *Movement Disorders*, *30*, 180–189. <https://doi.org/10.1002/mds.26075>
- West, A. B. (2017). Achieving neuroprotection with LRRK2 kinase inhibitors in Parkinson disease. *Experimental Neurology*, *298*, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.019>
- West, A. B., Moore, D. J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W. W., Ross, C. a., ... Dawson, T. M. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 16842–16847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507360102>
- West, A. B., Moore, D. J., Choi, C., Andrabi, S. A., Li, X., Dikeman, D., ... Dawson, T. M. (2007). Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human Molecular Genetics*, *16*, 223–232. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl471>
- Winslow, A. R., Chen, C. W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., ... Rubinsztein, D. C. (2010).  $\alpha$ -Synuclein impairs macroautophagy: Implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology*, *190*, 1023–1037. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003122>
- Wong, Y. C., & Krainc, D. (2017).  $\alpha$ -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, *23*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/nm.4269>
- Wszolek, Z. K., & Pfeiffer, R. F. (1992). Genetic considerations in movement disorders. *Current Opinion in Neurology & Neurosurgery*, *5*, 324–330.
- Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., ... Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *Journal of Neuroscience*, *22*, 1763–1771. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01763.2002>

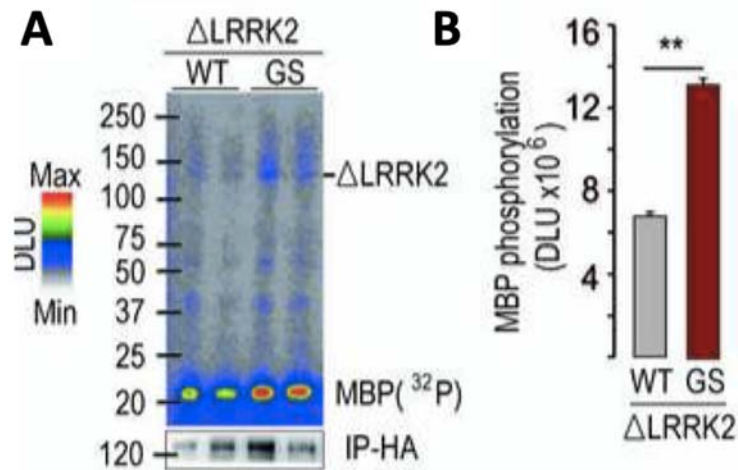
- Wu, Y. R., Tan, L. C., Fu, X., Chen, C. M., Au, W. L., Chen, L., ... Pei, Z. (2012). LRRK2 A419V is not associated with Parkinson's disease in different Chinese populations. *PLoS ONE*, *7*, e36123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036123>
- Xanthos, D. N., & Sandkühler, J. (2014). Neurogenic neuroinflammation: Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*, 43–53. <https://doi.org/10.1038/nrn3617>
- Xie, W., & Chung, K. K. K. (2012). Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *122*, 404–414. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07769.x>
- Xilouri, M., Brekk, O. R., Polissidis, A., Chrysanthou-Piterou, M., Kloukina, I., & Stefanis, L. (2016). Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats. *Autophagy*, *12*, 2230–2247. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1214777>
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., & Stefanis, L. (2009). Abberant  $\alpha$ -synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS ONE*, *4*, e5515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005515>
- Xiong, Y., Neifert, S., Karuppagounder, S. S., Liu, Q., Stankowski, J. N., Lee, B. D., ... Dawson, V. L. (2018). Robust kinase- and age-dependent dopaminergic and norepinephrine neurodegeneration in LRRK2 G2019S transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*, 201712648.
- Xiong, Y., Neifert, S., Karuppagounder, S. S., Stankowski, J. N., Lee, B. D., Grima, J. C., ... Dawson, V. L. (2017). Overexpression of Parkinson's disease-associated mutation LRRK2 G2019S in mouse forebrain induces behavioral deficits and  $\alpha$ -synuclein pathology. *Eneuro*, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0004-17.2017>
- Xu, J., Kao, S.-Y., Lee, F. J. S., Song, W., Jin, L.-W., & Yankner, B. A. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Medicine*, *8*, 600–606. <https://doi.org/10.1038/nm0602-600>
- Yacoubian, T. A., Cantuti-Castelvetri, I., Bouzou, B., Asteris, G., McLean, P. J., Hyman, B. T., & Standaert, D. G. (2008). Transcriptional dysregulation in a transgenic model of Parkinson disease. *Neurobiology of Diseases*, *29*, 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.11.008>
- Yahalom, G., Orlev, Y., Cohen, O. S., Kozlova, E., Friedman, E., Inzelberg, R., & Hassin-Baer, S. (2014). Motor progression of Parkinson's disease with the leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutation. *Movement Disorders*, *29*, 1057–1060. <https://doi.org/10.1002/mds.25931>
- Yang, X., Ren, H., Wood, K., Li, M., Qiu, S., Shi, F.-D., ... Liu, Q. (2018). Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP. *The FASEB Journal*, *32*, 3336–3345. <https://doi.org/10.1096/fj.201700833RR>
- Yuan, J., & Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, *407*, 402–409.
- Yun, S. P., Kam, T., Panicker, N., Kim, S., Oh, Y., Park, J., ... Lee, S. (2018). Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, *24*, 931–938. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
- Zabetian, C. P., Yamamoto, M., Lopez, A. N., Ujike, H., Mata, I. F., Izumi, Y., ... Kawakami, H. (2009). LRRK2 mutations and risk variants in Japanese patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *24*, 1034–1041. <https://doi.org/10.1002/mds.22514>
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., ... De Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, *55*, 164–173. <https://doi.org/10.1002/ana.10795>
- Zhang, L., Dong, Y., Xu, X., & Xu, Z. (2012). The role of autophagy in Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, *7*, 141–145.
- Zhang, F.-R., Huang, W., Chen, S.-M., Sun, L.-D., Liu, H., Li, Y., ... Liu, J.-J. (2009). Genomewide association study of leprosy. *New England Journal of Medicine*, *361*, 2609–2618. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903753>
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Uéda, K., ... Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of  $\alpha$ -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Research*, *1244*, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.067>
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., ... Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, *44*, 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>

**How to cite this article:** Cresto N, Gardier C, Gubinelli F, et al. The unlikely partnership between LRRK2 and  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2019;49:339–363. <https://doi.org/10.1111/ejn.14182>

### Chapitre I. Prérequis

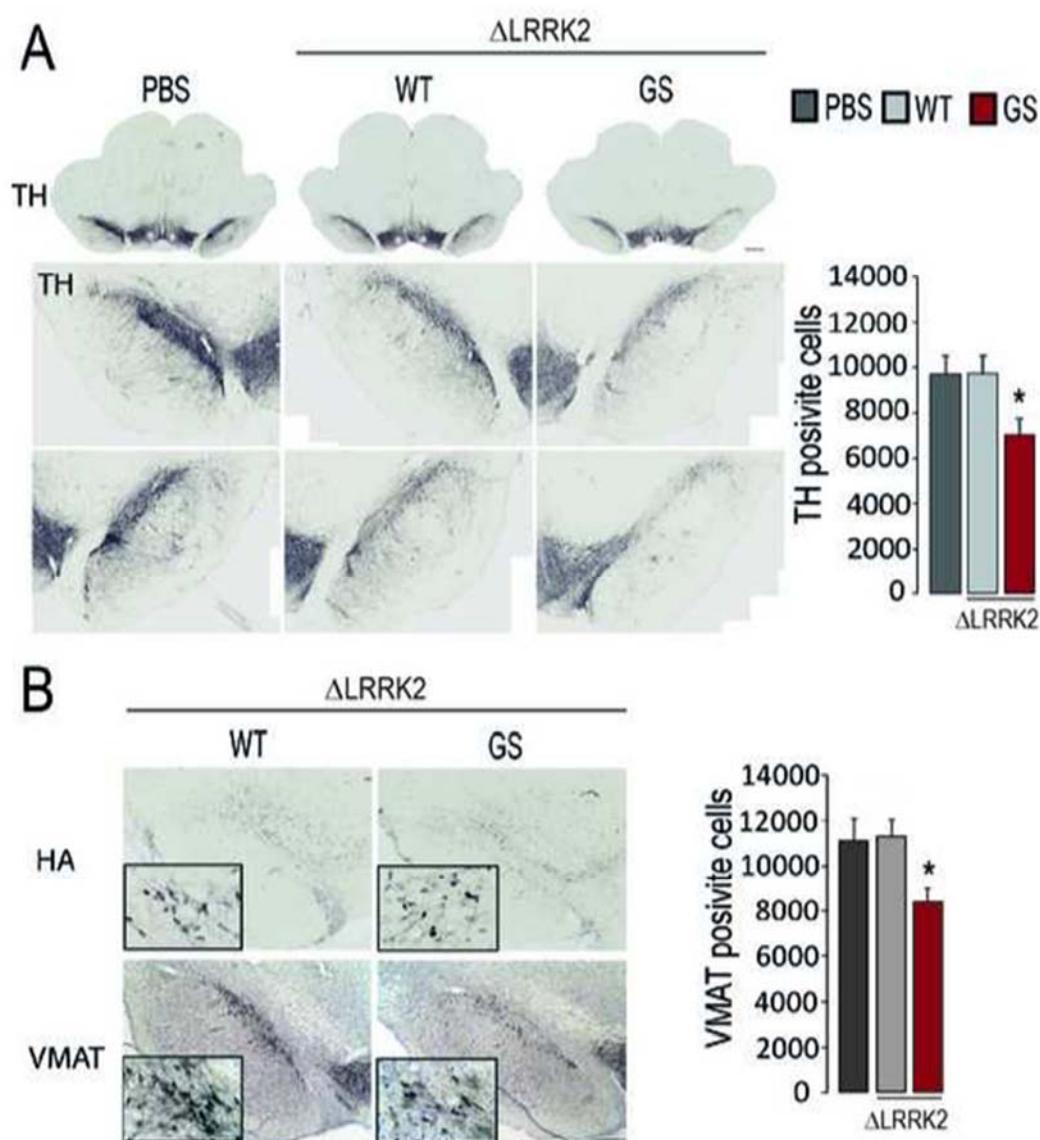
#### **I. Article 1 : le domaine C-terminal de LRRK2 avec la mutation G2019S est suffisant pour induire la dégénérescence des neurones dopaminergiques *in vivo* (Cresto, Gaillard, Gardier et al. 2019 - Annexe I)**

Il est globalement accepté que la toxicité de LRRK2 G2019S serait due à l'augmentation de son activité kinase, et que l'abolition de cette activité kinase empêcherait cette toxicité (Greggio et al. 2006; Smith et al. 2006; Xiong et al. 2017). Cependant, on ne sait pas si le domaine kinase de LRRK2 est suffisant à cette toxicité, ou si la totalité de la protéine est nécessaire. Plusieurs domaines semblent essentiels. Le domaine COR permet la dimérisation de LRRK2 (Daniëls, Baekelandt, et Taymans 2011; Gotthardt et al. 2008). Le domaine KIN contient la boucle d'activation, avec un motif caractéristique DYG (qui devient DYS avec la mutation G2019S) qui servirait de switch conformationnel pour contrôler l'activation de la protéine (Schmidt et al. 2019). Le domaine GTPase (ROC) aurait une influence sur l'activité kinase de LRRK2, bien que sa nature ne soit pas bien connue (Martin et al. 2014). L'ensemble de ces domaines de LRRK2 (ROC, COR, KIN) serait donc nécessaire à son activité kinase, et il a été montré qu'une protéine constituée uniquement de ces domaines était capable de se dimériser et de s'autophosphoryler en l'absence du fragment N-ter (Greggio et al. 2008; Jaleel et al. 2007). Afin d'étudier si ce domaine C-ter était suffisant à induire une toxicité de LRRK2 G2019S *in vivo*, Noémie Cresto a étudié pendant sa thèse l'effet de sa surexpression dans la SNpc de rats. Ce fragment, que nous appellerons  $\Delta$ LRRK2, est constitué des domaines ROC, COR, KIN et WD40. Tout d'abord, elle a confirmé *in vitro* que  $\Delta$ LRRK2 présentait bien une activité kinase, et que cette dernière était augmentée par la mutation G2019S (Figure 25A, B). En effet, une méthode permettant d'évaluer l'activité kinase d'une protéine est de mesurer l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  sur un substrat en sa présence. Pour cela,  $\Delta$ LRRK2 (WT ou G2019S) a été immunoprécipité à partir de lysats totaux de HEK transfectés, et la protéine purifiée a été incubée en présence de  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP et du substrat MBP (*Myelin Basic Protein*), puis un western blot a été réalisé. L'incorporation de  $^{32}\text{P}$  sur le MBP a permis de montrer que  $\Delta$ LRRK2 était capable de phosphoryler ce substrat. La forme G2019S phosphorylait plus efficacement MBP que la forme WT, indiquant que  $\Delta$ LRRK2 G2019S avait bien une activité kinase plus importante que  $\Delta$ LRRK2 WT. De plus, cette expérience a permis de montrer que  $\Delta$ LRRK2 G2019S était capable de s'autophosphoryler, ce qui est une caractéristique importante de la protéine LRRK2 (Greggio et al. 2008).



**Figure 25. Caractérisation biochimique des fragments C-ter de LRRK2.** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides codant pour ΔLRRK2 WT ou G2019S, et les protéines totales ont été extraites 48h plus tard. Les fragments ont ensuite été purifiés par immunoprécipitation grâce à leur tag HA, et incubés avec du 32P-γ-ATP et du MBP comme substrat. Après incubation, ΔLRRK2 et le MBP ont été séparés par SDS-PAGE et les protéines marquées au 32P ont été détectées avec un PhosphorImager. (A) Image représentative de l'incorporation de 32P sur le MBP après incubation avec les fragments WT ou G2019S purifiés. (B) Quantification de l'incorporation de 32P sur le MBP. \*\* p<0,01 test t de Student.

Par la suite, du PBS ou des AAV permettant l'expression de  $\Delta$ LRRK2 WT ou G2019S ont été injectés dans la SNpc de rats. Après 25 semaines, l'expression de  $\Delta$ LRRK2 G2019S, mais pas  $\Delta$ LRRK2 WT induisait une perte significative des neurones DA de la SNpc ( $\sim 30\%$ ) par rapport aux animaux ayant été injectés avec du PBS (Figure 26A, B). Cette étude a donc permis de montrer que le fragment C-ter de LRRK2 possédait une activité kinase qui était augmentée par la mutation G2019S, et que  $\Delta$ LRRK2 G2019S était suffisant pour induire une perte neuronale chez le rat après 6 mois d'expression.



**Figure 26. Evaluation histologique de l'effet de  $\Delta$ LRRK2 WT et G2019S dans la SNpc, 25 semaines post-injection.** Des AAVs codant pour  $\Delta$ LRRK2 ou du PBS comme contrôle ont été injectés de manière bilatérale dans la SNpc. (A) Immunohistochimie de la TH dans la SNpc. Le nombre de neurones TH+ a été évalué par stéréologie dans la totalité de la SNpc. (B) Immunohistochimie de VMAT dans la SNpc. Le nombre de neurones VMAT+ a été évalué par stéréologie dans la totalité de la SNpc.  $n=9$  animaux/groupe. \*  $p<0,05$  ANOVA à un facteur, post-hoc de Bonferroni. Echelle 750 $\mu$ m.

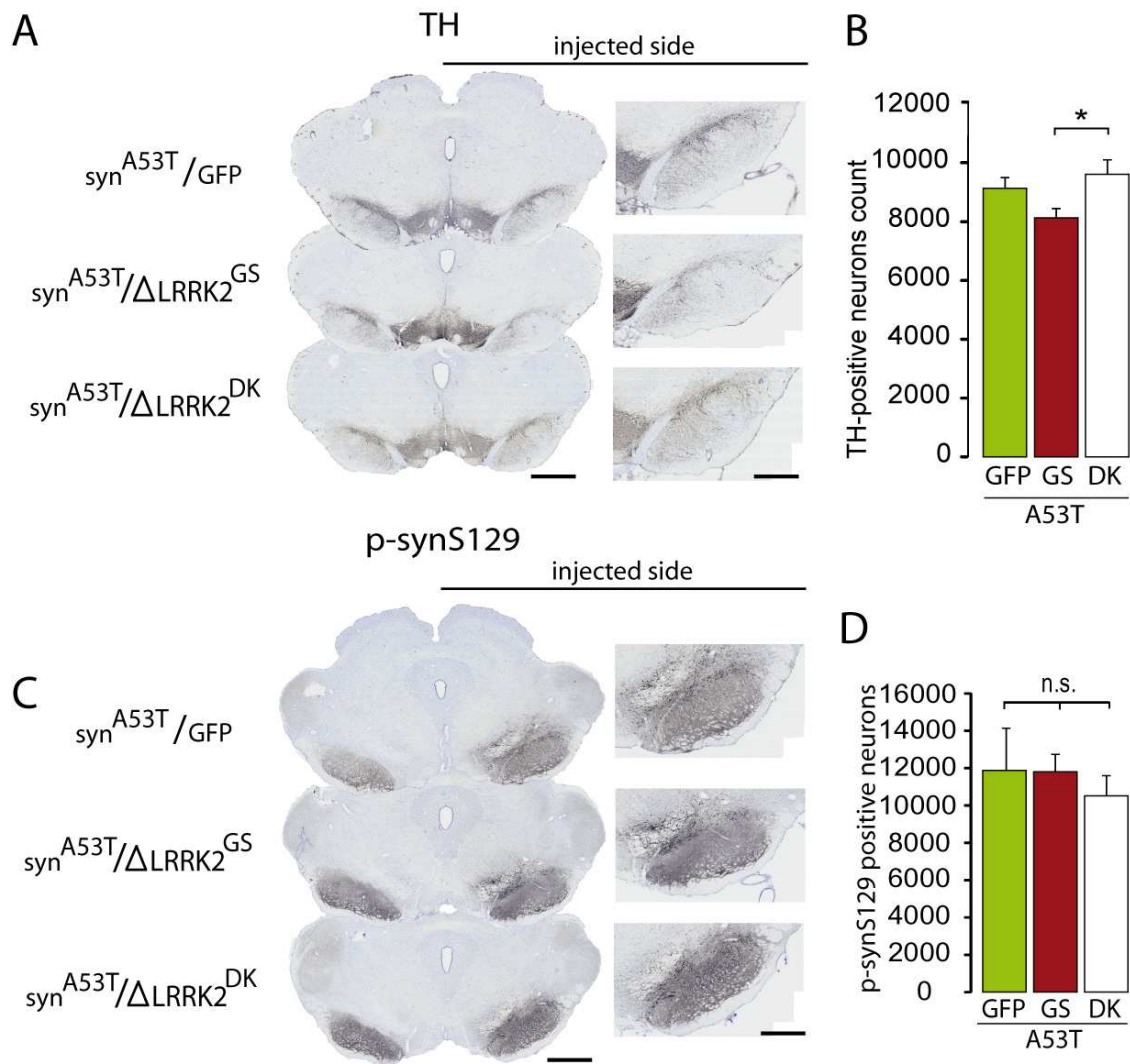


## **I. Article 2 : la surexpression du fragment C-terminal de LRRK2 présentant la mutation G2019S dans la SNpc augmente la neurotoxicité de l'αsyn A53T *in vivo* (Cresto, Gardier et al. En préparation - Annexe II)**

De nombreux éléments semblent indiquer l'existence d'une interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l'αsyn (Cresto, Gardier, et al. 2019). Après avoir montré que ΔLRRK2 G2019S était suffisant à induire une dégénérescence de la SNpc chez le rat, son effet sur la toxicité de l'αsyn a été étudié. L'étude a été réalisée avec l'αsyn A53T, car d'après la littérature et les données du laboratoire, elle permettrait l'induction d'une mort des neurones DA en quelques semaines, contre plusieurs mois pour la forme sauvage (Laura A. Volpicelli-Daley et al. 2016).

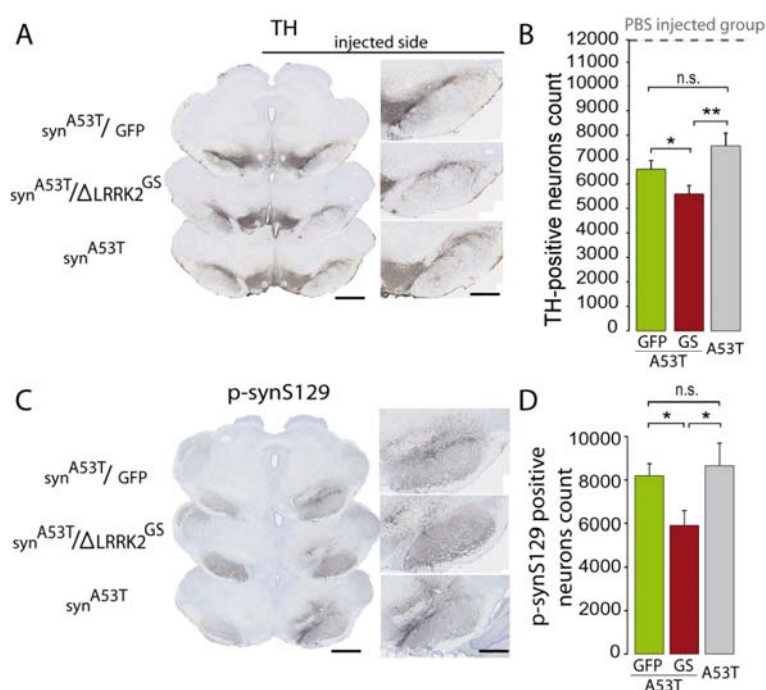
Pour ces expériences, ΔLRRK2 a été optimisé, en y rajoutant les AA nécessaires pour y inclure la S1292 (AA 1283-2527). En effet, ce site d'autophosphorylation semble important dans la toxicité de LRRK2 car sa substitution par une alanine réduit la toxicité de la mutation G2019S, et sa phosphorylation est proportionnelle à l'activité kinase de LRRK2 (Sheng et al. 2012). Ce ΔLRRK2 optimisé a donc été généré sous différentes formes permettant de moduler son activité kinase : sauvage (WT), G2019S, et G2019S/D1994A (DK). La mutation supplémentaire de la forme DK permet de bloquer l'activité kinase de la protéine. L'expression de ces différents variants de ΔLRRK2 dans la SNpc n'induisait pas de mort neuronale après 15 semaines.

Des vecteurs AAV-ΔLRRK2 et AAV-αsyn A53T ont donc été co-injectés dans la SNpc de rats afin d'étudier l'impact des différents variants de LRRK2 sur la mort neuronale induite par l'αsyn A53T, à des temps auxquels l'expression de ΔLRRK2 seul n'était pas toxique. Cette approche permettait une expression des deux protéines sélectivement dans les neurones, et environ 70% d'entre eux co-exprimaient ΔLRRK2 et l'αsyn. 6 semaines post-injection, l'αsyn A53T induisait déjà une perte des neurones DA. Cette neurodégénérescence était significativement plus forte chez les animaux exprimant également ΔLRRK2 G2019S par rapport à ceux co-exprimant ΔLRRK2 DK, ce qui semblait indiquer un mécanisme dépendant de l'activité kinase de LRRK2 (Figure 27A-D).



**Figure 27. Evaluation histologique de l'effet de  $\Delta LRRK2$  G2019S et DK sur la toxicité de l' $\alpha syn$  A53T dans la SNpc, 6 semaines post-injection.** Des AAVs codant pour l' $\alpha syn$  A53T et  $\Delta LRRK2$  G2019S/DK ou du GFP comme contrôle ont été injectés de manière unilatérale dans la SNpc. (A) Immunohistochimie de la TH dans la SNpc. (B) Le nombre de neurones TH+ a été évalué par stéréologie dans la totalité de la SNpc. (C) Immunohistochimie de la pS129  $\alpha syn$  dans la SNpc. (D) Le nombre de neurones pS129+ a été évalué par stéréologie dans la totalité de la SNpc. n=10 animaux/groupe. \*  $p < 0,05$  ANOVA à un facteur, post-hoc de PLSD. Echelle 400 et 750 $\mu m$ .

Après 15 semaines d'expression, la perte des neurones DA de la SNpc induite par l' $\alpha$ syn A53T était plus forte (~ 38%), et elle était augmentée par la co-expression de  $\Delta$ LRRK2 G2019S (~ 55%) (Figure 28A, B). Cette perte neuronale était associée à une diminution significative des fibres TH+ striatales, mais sans différences entre les animaux co-exprimant l' $\alpha$ syn A53T avec  $\Delta$ LRRK2 G2019S ou avec la GFP. Le nombre de neurones présentant un marquage positif pour l' $\alpha$ syn pS129 était également plus faible chez les animaux  $\alpha$ syn A53T/ $\Delta$ LRRK2 G2019S que chez les animaux exprimant l' $\alpha$ syn A53T seule, ce qui était cohérent avec la dégénérescence accrue des neurones chez ces animaux (Figure 28C, D). Malheureusement cette expérience à 15 semaines n'a pas pu être réalisée avec  $\Delta$ LRRK2 DK, mais les résultats obtenus à 6 semaines laissent supposer que son expression pourrait réduire la perte neuronale induite par l' $\alpha$ syn A53T.



**Figure 28. Evaluation histologique de l'effet de  $\Delta$ LRRK2 G2019S et DK sur la toxicité de l' $\alpha$ syn A53T dans la SNpc, 15 semaines post-injection.** Des AAVs codant pour l' $\alpha$ syn A53T et  $\Delta$ LRRK2 G2019S ou du GFP comme contrôle ont été injectés de manière unilatérale dans la SNpc. (A) Immunohistochimie de la TH dans la SNpc. (B) Le nombre de neurones TH+ a été évalué par stéréologie dans la totalité de la SNpc. (C) Immunohistochimie de la pS129  $\alpha$ syn dans la SNpc. (D) Le nombre de neurones pS129+ a été évalué par stéréologie dans la totalité de la SNpc. n=10 animaux/groupe. \* p<0,05, \*\* p<0,01, ANOVA à un facteur, post-hoc de PLSD. Echelle 50 et 200 $\mu$ m.

Ces résultats ont donc montré que  $\Delta$ LRRK2 G2019S pouvait augmenter la toxicité de l' $\alpha$ syn A53T pour les neurones DA *in vivo*, et que cet effet serait potentiellement dépendant de l'activité kinase de  $\Delta$ LRRK2, confirmant l'existence d'une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines.

Dans ces deux études, j'ai participé à la caractérisation biochimique de l'expression et de l'activité kinase de  $\Delta$ LRRK2.

## Chapitre II. Objectifs de la thèse

Le travail de Noémie Cresto a donc permis de montrer que  $\Delta$ LRRK2 G2019S augmentait la mort des neurones DA induite par l' $\alpha$ syn A53T, dans un modèle de rat 15 semaines après l'injection dans la SNpc de vecteurs AAV permettant l'expression de ces 2 protéines. Au cours de ma thèse, nous avons souhaité étudier plus précisément le mécanisme de cette interaction fonctionnelle entre les deux protéines. Les effets conjoints de LRRK2 et de l' $\alpha$ syn au niveau de la mitochondrie ont été relativement peu étudiés d'après la littérature. Ainsi, nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement à cette organelle. En améliorant notre compréhension du rôle de ces 2 protéines sur la mitochondrie, nous espérons participer à élucider les mécanismes complexes responsables du dysfonctionnement neuronal et de la mort cellulaire observés dans la MP.



# Etude *in vitro* de l'interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l' $\alpha$ syn – focus sur la mitochondrie

---

## Chapitre I. Choix du modèle

Afin de pouvoir étudier les mécanismes de l'interaction fonctionnelle entre  $\Delta$ LRRK2 et l' $\alpha$ syn, nous avons décidé de travailler dans un modèle *in vitro*, plus précisément des cultures primaires de neurones de rat, afin de rester au plus près du contexte des études *in vivo* réalisées précédemment. Cependant, nous avons réalisé des cultures de neurones corticaux, plutôt que de mésencéphale. Ce choix a été motivé par le fait que dans les cultures de mésencéphale on ne retrouve *in fine* que 10 à 20% de neurones DA TH+ (Gaven, Marin, et Claeysen 2014). Cette faible proportion de neurones DA rend l'étude d'effets liés à un environnement dopaminergique difficile. De plus, d'autres régions cérébrales sont atteintes dans la MP, dont le cortex dans lequel sont observés des CL aux stades les plus avancés de la maladie (Braak et al. 2003). L'utilisation de ce type cellulaire n'est donc pas sans pertinence dans le contexte de la MP. De plus, les cultures de cortex sont plus homogènes et plus reproductibles que les cultures de mésencéphale. L'ensemble de ces arguments nous a donc amené à travailler avec des cultures primaires de cortex de rats.

Nous avons gardé l'approche virale employée précédemment pour obtenir une expression maximale de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2. Cependant, dans l'idée de pouvoir par la suite travailler avec la forme entière de LRRK2, nous avons décidé d'utiliser des lentivirus (LV) plutôt que des AAV. En effet, ils ont un fort tropisme neuronal (Delzor et al. 2012) et ils ont une large capacité de clonage, contrairement aux AAV.

Nous avons donc mis en place un modèle de culture primaire de neurones corticaux dans lesquels nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux pour induire l'expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2.

## Chapitre II. Matériels et méthodes

### **HEK 293T et transfection**

Les cellules HEK 293T ont été cultivées dans du DMEM (Dubecco's modified Eagle Medium, Gibco), supplémenté avec 10% de sérum de vaux foetal (SVF), dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub>. 350 000 cellules ont été ensemencées par puits dans des plaques 6 puits. Une fois les cellules à 30-40% de confluence, elles ont été transfectées par la méthode du phosphate de calcium avec 4µg d'ADN. Elles ont été lysées 48h après transfection.

### **Cultures primaires de neurones et transduction**

Les procédures ont été effectuées en accord avec la régulation française (Directive EU 86/609 - French Act Rural Code R 214-87 to 131).

Les rattes gestantes ont été commandées chez Charles River. Au 17<sup>ème</sup> jour de gestation, elles ont été profondément anesthésiées à l'isoflurane, puis sacrifiées avec une dose létale de phénobarbital. Les embryons ont rapidement été récupérés et les cortex disséqués dans de l'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) supplémenté avec 10 mM d'HEPES (HBSS + HEPES). Les tissus ont été digérés pendant 10 min à 37°C dans une solution de trypsine à 0,025% dans de l'HBSS+HEPES. La trypsine a ensuite été inactivée en ajoutant 1mL de SVF. Après 3 lavages dans 5 mL d'HBSS+HEPES, les cortex ont été dissociés mécaniquement par 10 allers-retours à la pipette de 10 mL.

Les neurones dissociés ont été comptés avec un compteur LUNA (Logos Biosystems) et mis en culture dans du milieu Neurobasal™ (ThermoFisher) supplémenté avec 2% de B27 (ThermoFisher), 1% de pénicilline/streptomycine (ThermoFisher) et 1% de GlutaMax (ThermoFisher) (N+B27), dans des plaques de culture recouvertes de poly-L-lysine (PLL) (Sigma) à 1 mg/mL. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans un incubateur avec une atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub>. A 7 DIV (*Days In Vitro*), la moitié du milieu a été remplacée par du N+B27 frais.

Pour les cellules cultivées dans du BrainPhys™ (Stem Cell Technologies), la moitié du milieu a été remplacée à 5 et 8 DIV du BrainPhys™ supplémenté avec 2% de SM1 (Stem Cell Technologies) (Bardy et al. 2015).

La densité cellulaire était : 1 000 000/puits pour les plaques 6 puits, 500 000 cellules/puits pour les plaques 12 puits et 60 000 cellules/puits pour les plaques 96 puits.

Transduction par les lentivirus : à 1 DIV, les cellules ont été co-transduites avec un LV-CBA- $\alpha$ syn WT/A53T (10ng/100 000 cellules) + LV-PGK- $\Delta$ LRRK2 WT/G2019S/DK (20ng/100 000 cellules). A 4 DIV, la totalité du milieu a été remplacée par du N+B27 fraîchement préparé. Les cellules ont ensuite été entretenues comme il a été décrit ci-dessus.

## Production des lentivirus

Les lentivirus ont été produits dans des cellules HEK 293T, via un système à 4 plasmides, comme il a été décrit précédemment (Hottinger et al. 2000). Les vecteurs VIH-1 ont été pseudotypés avec la protéine VSV-G. Les virus ont été concentrés par ultracentrifugation, puis resuspendus dans du PBS (phosphate-buffer saline) avec 1% de BSA (bovine serum albumin). Le contenu en particules virales de chaque lot a été déterminé par une mesure des antigènes p24 (RETROtek, Gentaur). Les stocks ont été gardés à -80°C.

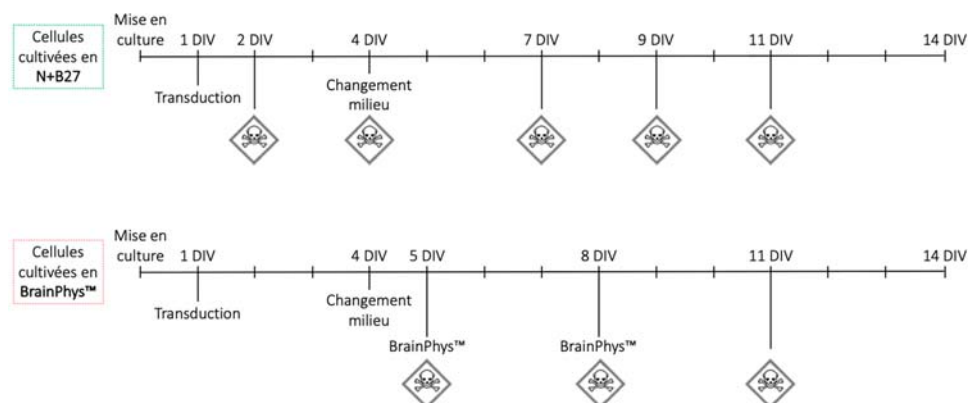
## Traitements aigus

La roténone (Calbiochem) a été mise en solution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 10mM, et gardée à -20°C. A 13-14 DIV, les cellules ont été traitées avec la dose indiquée de roténone ou avec du DMSO pendant 24h pour les études de viabilité cellulaire, et 6h pour les mesures de la quantité d'ATP et du potentiel de membrane mitochondrial.

## Traitements chroniques

Les cellules cultivées dans du N+B27 ont été traitées 5 fois avec la dose indiquée de roténone ou du DMSO comme contrôle. Le premier traitement a été fait à 2 DIV. Le deuxième à 4DIV en même temps que le changement de milieu post-transduction. Les 3 autres traitements ont été réalisés à 7, 9 et 11 DIV. Contrairement aux autres expériences, le milieu des cellules soumises à ces traitements chroniques n'a pas été changé à 7 DIV afin ne pas impacter la concentration de roténone dans les puits.

La culture des cellules dans du BrainPhys™ nécessitait deux changements de milieu à 4 et 8 DIV. Les traitements chroniques ont donc dû être adaptés et réduits à 3 traitements : les deux premiers en même temps que les changements de la moitié du milieu à 4 et 8 DIV, le 3<sup>ème</sup> à 11 DIV sans changement de milieu (Figure 29).



**Figure 29. Design expérimental des traitements chroniques, pour les cellules cultivées dans du N+B27 ou dans du BrainPhys™.** Représentation chronologique des différentes étapes de la culture cellulaire, depuis la mise en culture des neurones primaires jusqu'à l'arrêt des cultures à 14 DIV. La tête de mort représente les moments où les cellules ont été traitées avec de la roténone.



## Immunocytochimie

A 14 DIV, les cellules sur des lamelles de verre ont été fixées pendant 20 min dans 3,7% de formaldéhyde + 5% de sucrose, puis lavées deux fois dans le PBS. Les cellules fixées ont été incubées dans un tampon de blocage (PBS + 0,1% Triton™ X-100 (PBS-T) + 3% NGS) pendant 30 min à température ambiante (TA). Les lamelles en verre ont été incubées pendant 2h à TA avec les anticorps primaires indiqués (voir Tableau 4 pour plus de détails concernant les différents anticorps utilisés) dans du tampon de blocage, puis elles ont été lavées 3 fois dans du PBS-T. Elles ont ensuite été incubées pendant 1h à TA avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes Alexa (1/000) préparés dans du tampon de blocage. Après 3 lavages dans le PBS, les lamelles ont été montées dans du Mowiol®. Les images ont ensuite été acquises en microscopie à fluorescence.

## Western blots

A 14 DIV, les cellules ont été lavées 1 fois dans du PBS froid, puis les protéines ont été extraites dans un tampon de lyse [10 mM de Tris (pH 8.0), 150 mM de NaCl, 1% de NP40, 1 mM d'EDTA, 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma), 1% de cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma), et 1mM de PMSF]. Les homogénats ont été centrifugés à 15 000g pendant 10 min à 4°C, et le surnageant a été récupéré. Les concentrations de protéines ont été déterminées grâce au kit BCA (ThermoFisher). 20 µg d'extraits protéiques totaux ont été séparés dans un gel de 4-20% de SDS-polyacrylamide (Bio-Rad). Le transfert a été effectué sur une membrane de nitrocellulose pendant 10 min avec le système de transfert turbo Trans-Blot® (Bio-Rad). Le même protocole a été suivi pour les HEK 293T, sauf que les protéines ont été extraites dans 1% de Triton-X 100 au lieu du NP40. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 1h à TA, dans du TBS + 0,1% de Tween 20 (TBS-T) + 5% de lait écrémé en poudre. Elles ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires indiqués (voir tableau 4). Après 3 lavages dans le TBS-T, les membranes ont été incubées pendant 1h à TA avec les anticorps secondaires conjugués à l'HRP adaptés (voir tableau 4). Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois dans du TBS-T, puis incubées avec du réactif ECL (Clarity Western ECL Substrate, Biorad), selon les instructions du fournisseur. Les protéines ont été détectées avec un système Chemidoc (Bio-Rad).

**Tableau 4. Liste des anticorps utilisés en western blot (WB) et en immunofluorescence (IF).**

Anticorps	Ref	Espèce	Dilution - WB	Dilution - IF
Actine	A2066 (Sigma)	Lapin	1/3000	X
pS129 $\alpha$ syn	AB51253 (Abcam)	Lapin	1/1000	1/200
$\alpha$ syn	AB5038 (Biolegend)	Lapin	1/1000	1/1000

pS616 DRP1	4494 (Cell Signaling)	Souris	1/1000	X
DRP1	611112 (BD)	Souris	1/1000	X
Fis1	ALX-210-1037 (Enzo)	Lapin	1/250	X
pS953 LRRK2	AB133450 (Abcam)	Lapin	1/1000	X
pS1292 LRRK2	AB203181 (Abcam)	Lapin	1/1000	X
LRRK2	13046 (Cell Signaling)	Lapin	1/1000	1/200
MAP2	4403 (Sigma)	Ms	X	1/200
Mfn2	9482 (Cell Signaling)	Souris	1/1000	X
NeuN-Alexa Fluor 488 Conjugated	MAB377X (Chemicon)	X	X	1/500
Anti-Ms IgG alexa Fluor 488	A11001 (ThermoFisher)	Chèvre	X	1/1000
Anti-Rb IgG alexa 488	A11008 (ThermoFisher)	Chèvre	X	1/1000
Anti-Rb IgG alexa 555	A21428 (ThermoFisher)	Chèvre	X	1/1000
Anti-Ms IgG alexa 594	A11005 (ThermoFisher)	Chèvre	X	1/1000
Anti-Ms IgG alexa 633	A21050 (ThermoFisher)	Chèvre	X	1/1000
HRP conjugated-anti Ms	A16011 (ThermoFisher)	Âne	1/5000	X
HRP conjugated-anti Rb	A16023 (ThermoFisher)	Âne	1/5000	X

### **Viabilité cellulaire, taux d'ATP et potentiel de membrane mitochondrial**

Les cellules ont été cultivées dans des plaques 96 puits à bords blancs (pour l'ATP) ou noirs. Pour mesurer la viabilité cellulaire à 14 DIV, de la résazurine (Sigma) a été utilisée. C'est un composé bleu faiblement fluorescent qui est réduit par les cellules métaboliquement actives en résorufine, qui elle fluoresce fortement dans le rouge. La résazurine a été ajoutée au milieu et après 2h d'incubation, la fluorescence a été mesurée avec un lecteur de microplaques (Safas),  $\lambda_{ex} = 560\text{nm}$  et  $\lambda_{em} = 590\text{nm}$ .

Les taux d'ATP totaux ont été mesurés grâce au kit CellTiter-Glo® 2.0 (Promega). Ce kit contient un détergent, ainsi que de la luciférine et de la luciférase. Le détergent permet de lyser les cellules et de libérer leur contenu en ATP. La luciférase catalyse une réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en présence d'ATP, ce qui résulte dans l'émission d'un photon. La quantité de lumière émise est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans les puits. 100 $\mu\text{L}$  de réactif a été ajouté dans chaque puits et la plaque a immédiatement été soumise à une agitation orbitale pendant 2 min pour induire la lyse des cellules. La luminescence a été mesurée avec un luminomètre (Glomax, Promega) après 10 min d'incubation à TA (1 s de temps d'intégration par puits).

Le potentiel de membrane mitochondrial a été mesuré grâce à la sonde TMRE (Sigma). C'est une sonde fluorescente sensible au potentiel de membrane. Elle est perméante aux cellules, et peut s'accumuler dans la mitochondrie en fonction de son potentiel de membrane. Lorsque ce dernier diminue, la mitochondrie ne peut plus retenir le TMRE qui diffuse alors hors de la mitochondrie, ce qui entraîne une diminution de la fluorescence mesurée. 200 nM de TMRE ont été ajoutés par puits. Après 30 min d'incubation, les cellules ont été lavées une fois dans de l'EBSS (Sigma) et la fluorescence a été mesurée grâce à un lecteur de microplaques (Safas),  $\lambda_{ex} = 540\text{nm}$  and  $\lambda_{em} = 595\text{nm}$ .

### **Analyse statistique**

Les données sont représentées par la moyenne +/- erreur standard de la moyenne (SEM). La normalité de la distribution des données a été évaluée par un test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances par un test de Levene, en utilisant le logiciel Statistica 13.0. Toutes les données exprimées en pourcentage ont été transformées en  $Q = \arcsin(\sqrt{VP/100})$  et l'analyse statistique a été effectuée sur la variable Q. Quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances étaient remplies (données brutes ou transformées), une ANOVA à un facteur a été effectuée, suivie d'un test post-hoc de Tukey. Lorsque les conditions de normalité et/ou d'homogénéité des variances n'étaient pas remplies, des tests non paramétriques ont été appliqués : Mann-Whitney et Kruskal-Wallis pour la comparaison de 2 groupes ou plus, respectivement.

## Chapitre III. Résultats et Article 3

### I. Résultats

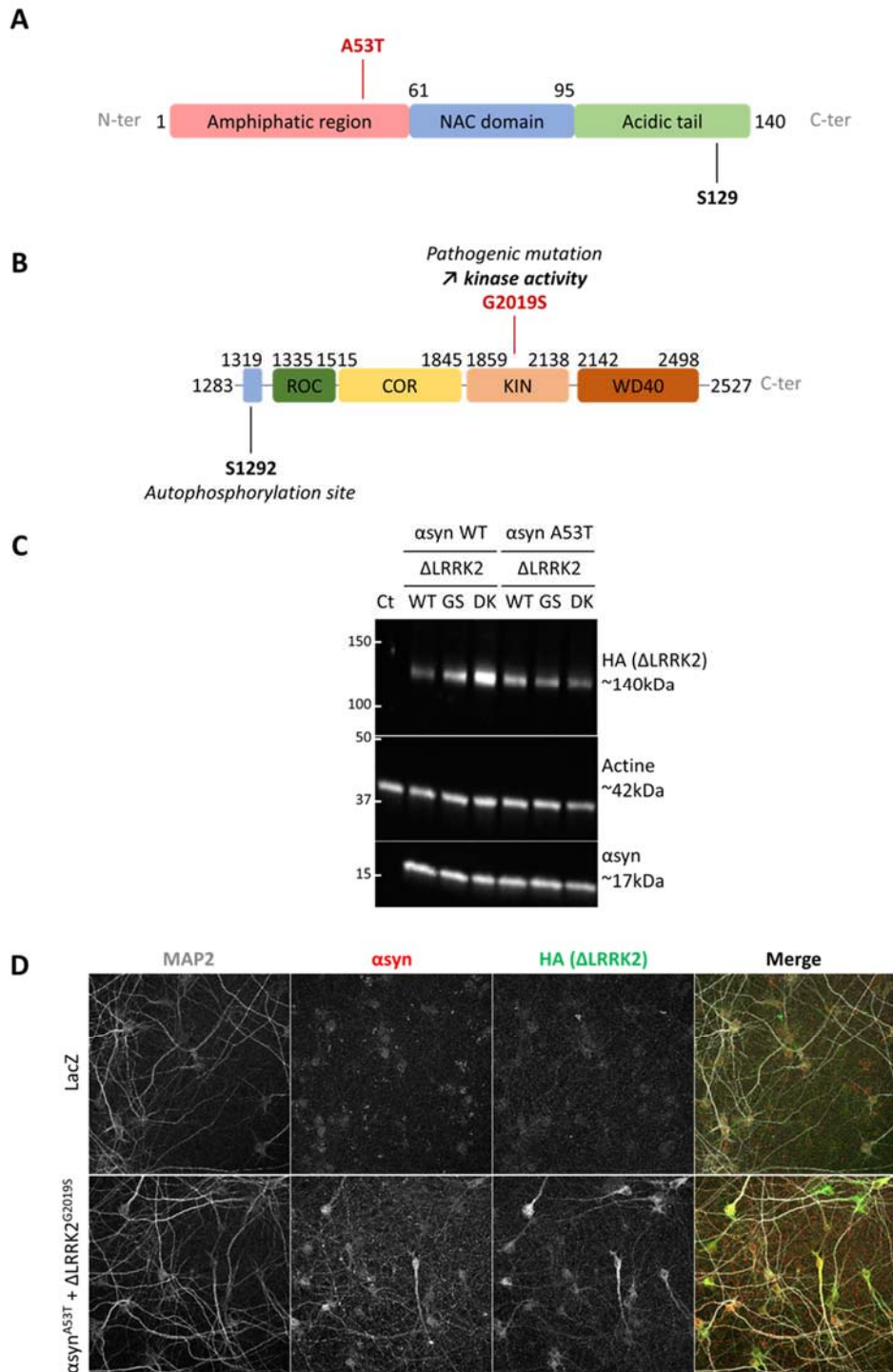
#### A. Expression de l'αsyn et de différentes formes de LRRK2 dans les neurones primaires

Afin d'exprimer nos protéines d'intérêt dans les cultures primaires de neurones, nous avons généré des LV codant pour l'αsyn WT et A53T (Figure 30A), ainsi que pour ΔLRRK2 WT, G2019S, et G2019S/D1994A (DK, pour *Dead Kinase*) (Figure 30B). La mutation D1994A a été rajoutée dans la boucle catalytique afin de bloquer l'activité kinase de ΔLRRK2 G2019S (Greggio et al. 2006; Smith et al. 2006; West et al. 2007). Les constructions de ΔLRRK2 contiennent toutes un tag HA, qui permet de les identifier grâce à un anticorps dirigé contre ce tag. Nous avons décidé de travailler à la fois avec les formes WT et A53T de l'αsyn, car la forme sauvage peut être toxique lorsqu'elle est surexprimée mais la mutation A53T aggrave cette toxicité. Nous espérons ainsi observer des effets accrus avec l'αsyn A53T par rapport à l'αsyn WT.

Nous avons donc vérifié que les LV permettaient l'expression de l'αsyn et de ΔLRRK2, 13 jours après la transduction lentivirale des cultures. Par western blot, nous avons confirmé que les cultures exprimaient bien l'αsyn et ΔLRRK2, quelles que soient les variants (Figure 30C). L'expression de ΔLRRK2 ne modifiait pas celle de l'αsyn. Nous avons ensuite vérifié la localisation cellulaire de ces deux protéines par immunofluorescence, en utilisant des anticorps dirigés contre l'αsyn et HA (pour ΔLRRK2), et aussi MAP2 pour identifier les neurones. L'αsyn présentait une plus forte expression dans les prolongements neuronaux que dans le soma, alors que ΔLRRK2 était majoritairement exprimée dans les corps cellulaires (Figure 30D). Environ 70% des neurones exprimant ΔLRRK2 exprimaient aussi l'αsyn (non montré). Cette approche lentivirale permet donc une bonne expression neuronale de l'αsyn et de ΔLRRK2.

#### B. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et l'homéostasie mitochondriale

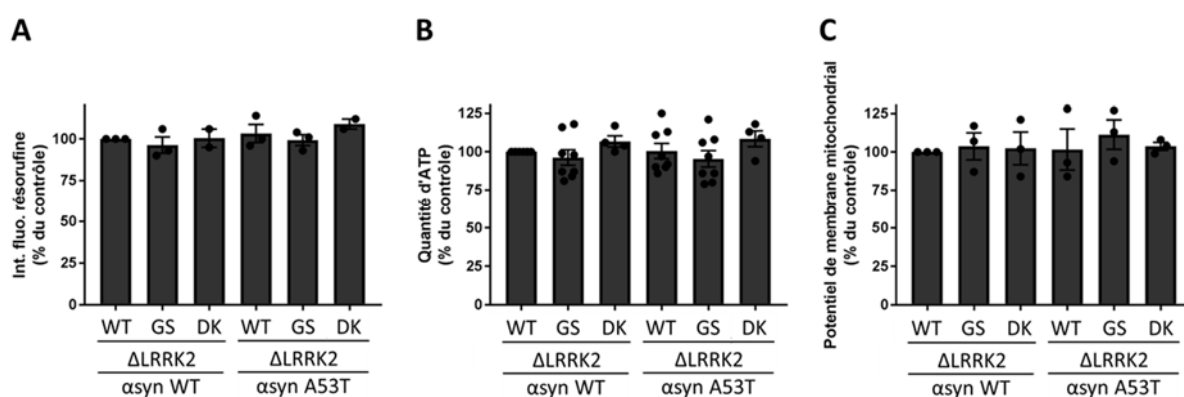
Nous avons transduit les cellules à 1 DIV pour induire l'expression des différentes protéines, puis mesuré la viabilité cellulaire, le taux d'ATP et le potentiel de membrane mitochondrial à 13 DIV. Pour chaque paramètre, nous avons comparé les valeurs à celles des cellules exprimant l'αsyn WT + ΔLRRK2 WT. En effet, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'expression de ΔLRRK2 sur la toxicité mitochondriale induite par l'αsyn. L'αsyn A53T étant supposée être plus toxique que l'αsyn WT, nous avons donc pris cette dernière comme référence. De plus, la forme sauvage ΔLRRK2 n'étant pas pathogène chez l'homme, nous l'avons donc également prise comme référence. Dans ces conditions, nous pouvions étudier si l'αsyn A53T était plus toxique que l'αsyn WT dans notre modèle, et si cette toxicité était aggravée par l'augmentation de l'activité kinase de ΔLRRK2 (ΔLRRK2 G2019S), et annulée par l'abolition de cette activité kinase (ΔLRRK2 DK).



**Figure 30. Expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 dans les neurones primaires.** Représentations schématiques (A) de l' $\alpha$ syn et (B) de  $\Delta$ LRRK2 et de leurs différents domaines. Adaptés de De Wit et al. 2018 et de Hunn et al. 2015 respectivement. Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduites à 1 DIV avec des LV codant pour l' $\alpha$ syn A53T et pour  $\Delta$ LRRK2 WT, G2019S ou DK, et LacZ (Ct) comme contrôle. (C) A 14 DIV, les protéines totales ont été extraites et des westerns blot ont été effectués pour vérifier le niveau d'expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2, avec l'actine comme contrôle de charge. Western blot représentatif, N=3. (D) A 14 DIV, les cellules ont été fixées et immunomarquées avec des anticorps reconnaissant MAP2, l' $\alpha$ syn et HA (pour  $\Delta$ LRRK2), afin de vérifier leur localisation cellulaire. Images représentatives prises au microscope confocal. N=3, grossissement 40X.

Nous avons dans un premier temps évalué si la co-expression de  $\Delta$ LRRK2 avec l' $\alpha$ syn modifiait la viabilité cellulaire. L'observation microscopique de nos cultures ne nous a pas permis d'identifier de conditions dans lesquelles les neurones semblaient souffrir. Nous avons confirmé ces observations par un test de viabilité cellulaire à la résazurine, qui a permis de conclure que l'expression de l' $\alpha$ syn WT ou A53T n'induisait pas de mort cellulaire, et qu'il n'y avait pas non plus d'effet de  $\Delta$ LRRK2 (Figure 31A). La mesure du taux d'ATP et du potentiel de membrane mitochondrial n'a pas non plus mis en évidence d'atteinte de la mitochondrie par l' $\alpha$ syn WT ou A53T, ni de modulation par  $\Delta$ LRRK2 (Figure 31B, C).

Dans ces conditions expérimentales, nous n'avons donc pas pu détecter d'effet toxique de l' $\alpha$ syn A53T par rapport à l' $\alpha$ syn WT, ni de modulation par la co-expression de  $\Delta$ LRRK2 avec l' $\alpha$ syn.

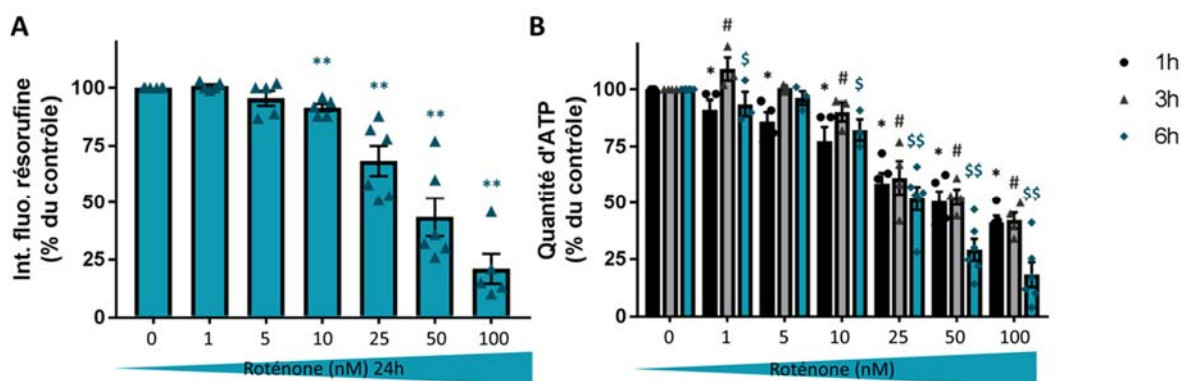


**Figure 31. Effet de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale.** Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduites à 1 DIV avec des LV codant pour l' $\alpha$ syn WT/A53T et pour  $\Delta$ LRRK2 WT, G2019S ou DK. (A) A 14 DIV, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=5, N=3. (B) La quantité d'ATP a été évaluée par le test CellTiter-Glo® 2. n=5, N=4. (C) Le potentiel de membrane mitochondrial a été évalué grâce à la sonde TMRE. n=5, N=3. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

### C. Effet de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et l'homéostasie mitochondriale après un stress mitochondrial aigu

Comme il a été expliqué précédemment, pour diverses raisons nous avons fait le choix de travailler dans des cultures de cortex de rat par rapport à des cultures de mésencéphale. Dans la MP, il est supposé que l'atteinte préférentielle des neurones DA de la SNpc, par rapport à d'autres régions cérébrales, serait due à divers facteurs, notamment le métabolisme de la DA qui induirait un niveau de stress oxydant basal plus élevé que dans les autres structures cérébrales (voir Introduction, chapitre I, partie II.B.3). Nous avons supposé que l'absence de toxicité de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 dans les cultures de cortex pourrait être due à l'absence de ce stress oxydant. La roténone est une toxine mitochondriale qui peut induire un syndrome parkinsonien chez l'homme en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Goldman 2014). Nous avons donc

essayé de reproduire ce stress mitochondrial sous-létal en traitant les neurones matures avec une dose aiguë de roténone. Nous avons réalisé une étude avec des doses croissantes de cette toxine mitochondriale et mesuré la production d'ATP 1h, 3h et 6h post-traitement, ainsi que la viabilité cellulaire après 24h d'exposition. La viabilité cellulaire (Figure 32A) et la quantité d'ATP (figure 32B) étaient diminuées de manière dose-dépendante, confirmant la toxicité de la roténone pour les neurones. Nous avons décidé d'utiliser la dose de 25nM de roténone, entraînant une diminution des taux d'ATP d'environ 50% à 6h et une diminution de la viabilité cellulaire d'environ 30% à 24h, afin de recréer une condition de stress pour les cellules rappelant celui qui est retrouvé dans les neurones DA.



**Figure 32. Mise au point du traitement aigu à la roténone.** Des neurones primaires de cortex de rats ont été traités à 13-14 DIV avec des doses croissantes de roténone diluée dans du DMSO. (A) Après 24h de traitement, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=10, N=6. \*\* p<0,01 par rapport au contrôle traité par le véhicule seul, test de Mann-Whitney. (B) Après 1, 3 ou 6h de traitement, la quantité d'ATP a été évaluée par le test CellTiter-Glo® 2. n=7, N=4. \* p<0,05 par rapport au contrôle traité par le véhicule seul pendant 1h. # p<0,05 par rapport au contrôle traité par le véhicule seul pendant 3h. \$ p<0,05, \$\$ p<0,01 par rapport au contrôle traité par le véhicule seul pendant 6h. Test de Mann-Whitney. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

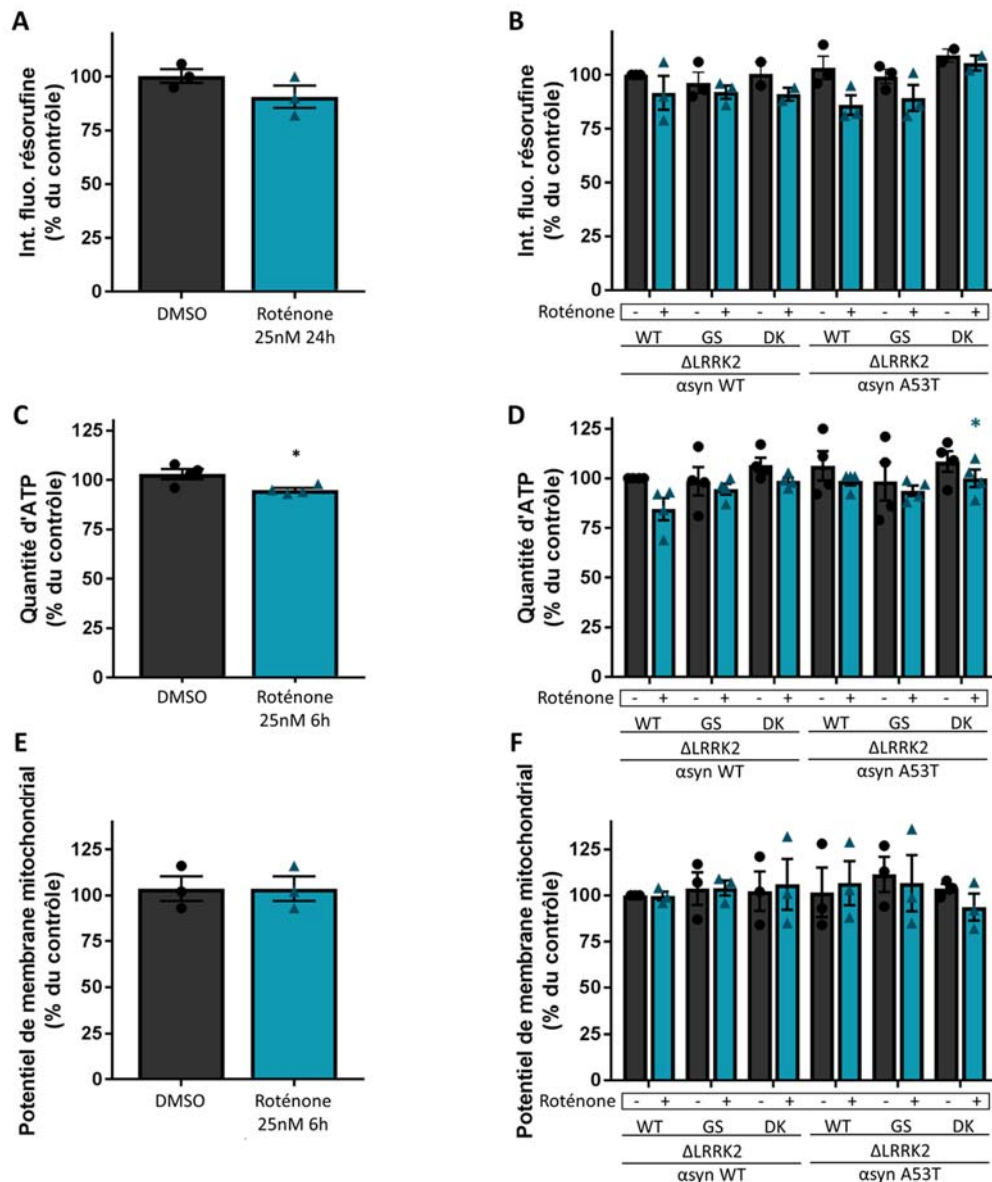
Les cellules transduites avec les LV ont donc été traitées avec 25nM de roténone pendant 24h, puis la viabilité cellulaire a été évaluée par un test à la résazurine. Dans toutes les expériences qui vont suivre, les valeurs ont été rapportées à 100% par rapport aux cellules  $\alpha$ syn WT +  $\Delta$ LRRK2 WT non traitées. Nous avons tout d'abord évalué l'effet du traitement sur les cellules transduites, afin de voir s'il y avait globalement une différence de viabilité cellulaire entre les cellules transduites non traitées et celles traitées avec de la roténone. Pour cela, nous avons réalisé la moyenne de la viabilité cellulaire dans toutes les conditions non traitées, et la moyenne dans toutes les conditions traitées, et nous avons comparé les valeurs obtenues. Cette même démarche a, par la suite, été appliquée pour chaque paramètre mesuré. Ainsi, nous avons pu constater qu'il y avait une diminution globale de la viabilité cellulaire non significative d'environ 10% dans les cellules traitées avec de la roténone par rapport aux cellules non traitées (Figure 33A). Dans les cellules non transduites, la diminution de la viabilité cellulaire à cette dose était plutôt de l'ordre de 25%, ce qui signifie soit que les cellules transduites sont moins sensibles à la toxicité de la roténone, soit que la transduction par les LV est elle-même toxique et abaisse donc un peu la viabilité des cellules, même non traitées. D'expérience, nous avons pu constater que la transduction lentivirale était légèrement toxique pour les cellules, ce qui irait plutôt dans le sens de la seconde hypothèse.

Nous avons ensuite étudié plus en détails l'effet de la co-expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur la sensibilité des cellules à la roténone. Nous n'avons cependant pas observé de différence de viabilité cellulaire entre les différentes conditions de co-transduction (Figure 33B).

Nous avons également évalué l'effet de la co-expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur la sensibilité à la roténone par la mesure du taux d'ATP et du potentiel de membrane mitochondrial. Un temps plus court (6h) a été utilisé par rapport à l'évaluation de la viabilité cellulaire car ces phénomènes sont plus rapides et plus transitoires. De la même manière que précédemment, nous avons d'abord évalué l'effet global du traitement par la roténone sur le taux d'ATP des cellules transduites. Le traitement des cellules transduites par 25nM de roténone pendant 6h induisait une diminution significative d'environ 10% du taux d'ATP par rapport aux cellules transduites non traitées (Figure 33C). Plus précisément, nous avons pu observer que les cellules co-exprimant  $\Delta$ LRRK2 DK avec l' $\alpha$ syn A53T présentaient un taux d'ATP significativement plus élevé que le contrôle, ce qui pourrait signifier que ces cellules seraient moins sensibles à la toxicité de la roténone que les autres (Figure 33D). L'étude du potentiel de membrane mitochondrial ne nous a pas permis d'observer d'effet de la roténone sur les cellules transduites, ni de différence entre les différentes conditions (Figure 33E, F).

Dans ces conditions expérimentales, l' $\alpha$ syn A53T n'augmente donc pas la sensibilité des neurones à la roténone par rapport à l' $\alpha$ syn WT, et la co-expression de  $\Delta$ LRRK2 ne module pas non plus cette sensibilité, en dehors d'un léger effet protecteur de  $\Delta$ LRRK2 DK lorsqu'il est co-exprimé avec l' $\alpha$ syn A53T.



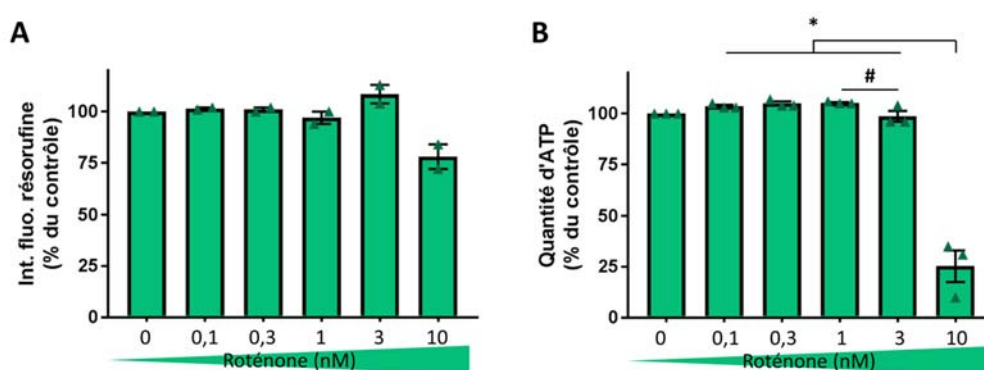


**Figure 33. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale, après un traitement aigu à la roténone.** Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduits à 1 DIV avec des LV codant pour l'αsyn WT/A53T et pour ΔLRRK2 WT, G2019S ou DK. A 13 DIV, ils ont été traités avec 25nM de roténone ou le véhicule en contrôle. (A,B) Après 24h de traitement, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=5, N=3. (A) Comparaison de la viabilité cellulaire moyenne (toutes conditions confondues) des cellules traitées avec celle des cellules non traitées. (B) Variation de la viabilité cellulaire des cellules traitées ou non traitées en fonction des différentes conditions de co-transduction. (C-F) A 14 DIV, les cellules ont été traitées avec 25nM de roténone ou le véhicule en contrôle. Après 6h de traitement, le taux d'ATP (n=5, N=4) et le potentiel de membrane mitochondriale (n=5, N=3) ont été évalués par le test CellTiter-Glo® 2 et la sonde TMRE, respectivement. (C) Comparaison du taux d'ATP et (E) du potentiel de membrane moyens (toutes conditions confondues) des cellules traitées avec ceux des cellules non traitées. (D) Variation du taux d'ATP et (F) du potentiel de membrane des cellules traitées ou non traitées en fonction des différentes conditions de co-transduction. \* p<0,05 par rapport au contrôle, ANOVA à 1 facteur, post-hoc de Tukey. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

#### D. Effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 sur la viabilité cellulaire et l'homéostasie mitochondriale après un stress mitochondrial chronique

La MP est une maladie chronique, et la toxicité de la roténone chez l'homme résulte d'une exposition prolongée à cette toxine. De plus, dans les études réalisées au laboratoire, ΔLRRK2 n'était toxique qu'après une très longue période d'incubation. Si l'effet de ΔLRRK2 était modéré *in vivo*, il est possible qu'il faille soumettre les cellules à un stress plus important *in vitro* pour potentiellement voir un effet de ΔLRRK2.

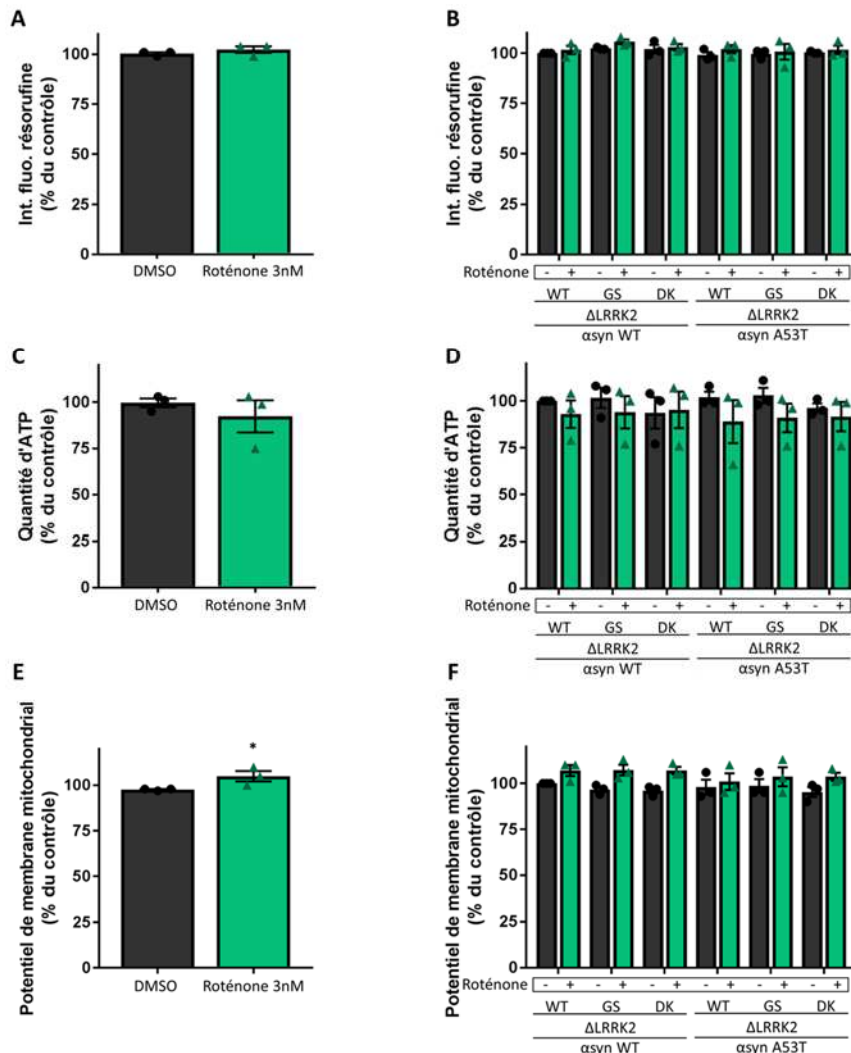
Nous avons donc posé l'hypothèse qu'un stress aigu ne serait pas suffisant pour révéler un effet différentiel, ni de l'αsyn A53T par rapport à l'αsyn WT, ni des différentes formes de ΔLRRK2 sur l'αsyn. De la même manière qu'avec le traitement aigu, nous avons réalisé une étude avec des doses croissantes de roténone. Nous avons traité les cellules tous les 2-3 jours jusqu'à 14 DIV (5 traitements au total), puis nous avons comparé l'effet de ces différentes doses sur la viabilité cellulaire et le taux d'ATP. Pour la viabilité cellulaire, nous n'avons réalisé cette expérience que deux fois et n'avons donc pas pu effectuer d'analyse statistique. Cependant, nous n'avons observé de diminution de la viabilité cellulaire (~20%) qu'à la dose maximale utilisée (Figure 34A). En ce qui concerne le taux d'ATP, une réelle diminution n'a également été observée qu'à la plus forte dose (~75%) (Figure 34B). Le traitement chronique semble donc induire une toxicité avec un seuil marqué entre 3 et 10 nM. Afin de ne pas nous placer dans des conditions de toxicité trop importante, nous avons donc choisi d'employer la dose de 3nM.



**Figure 34. Mise au point du traitement chronique à la roténone.** Des neurones primaires de cortex de rats ont été traités à 2, 4, 7, 9 et 11 DIV avec des doses croissantes de roténone diluée dans du DMSO. (A) A 14 DIV, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=10, N=3. (B) La quantité d'ATP a été évaluée par le test CellTiter-Glo® 2. n=10, N=2. \* p<0,05 par rapport aux cellules traitées avec 0,1 à 3nM de roténone. # p<0,05 par rapport aux cellules traitées avec 1nM de roténone. Test de Mann-Whitney. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

Les cellules ont donc été traitées tous les 2-3 jours avec 3nM de roténone, ou du DMSO comme contrôle. Pour la viabilité cellulaire et le taux d'ATP, nous n'avons observé aucun impact du traitement sur les cellules transduites (Figure 35A,C), ni aucune différence de sensibilité au traitement entre les différentes conditions (Figure 35B,D). En revanche, le traitement chronique à la roténone induisait une augmentation

significative d'environ 5% du potentiel de membrane mitochondrial par rapport aux cellules traitées avec le véhicule (Figure 35E). Aucune différence de sensibilité à ce traitement n'a cependant été observée entre les différentes conditions (Figure 35F).



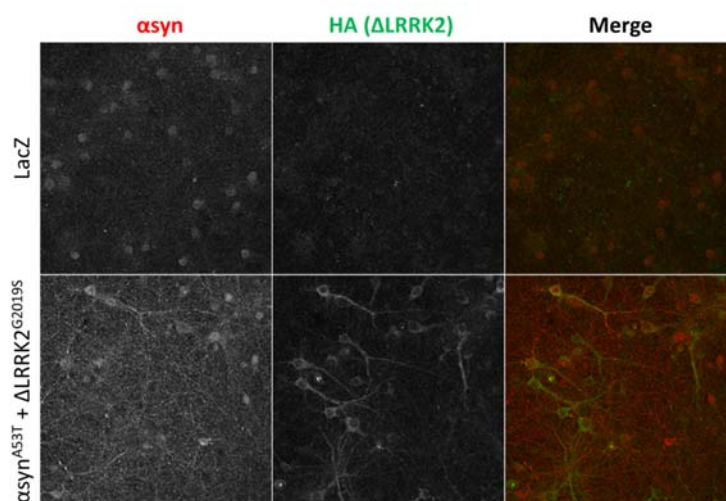
**Figure 35. Effet de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale, avec ou sans traitement chronique à la roténone.** Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduits à 1 DIV avec des LV codant pour l' $\alpha$ syn WT/A53T et pour  $\Delta$ LRRK2 WT, G2019S ou DK. Ils ont ensuite été traités 5 fois avec 3nM de roténone ou le véhicule comme contrôle (A,B) A 14 DIV, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=4, N=3. (A) Comparaison de la viabilité cellulaire moyenne (toutes conditions confondues) des cellules traitées avec celle des cellules non traitées. (B) Variation de la viabilité cellulaire des cellules traitées ou non traitées en fonction des différentes conditions de co-transduction. (C-F) Le taux d'ATP et le potentiel de membrane mitochondriale ont été évalués par le test CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2 et la sonde TMRE, respectivement. (C) Comparaison du taux d'ATP et (E) du potentiel de membrane moyens (toutes conditions confondues) des cellules traitées avec ceux des cellules non traitées. n=4, N=3. (D) Variation du taux d'ATP et (F) du potentiel de membrane des cellules traitées ou non traitées en fonction des différentes conditions de co-transduction. \* p<0,05 par rapport au contrôle, ANOVA à 1 facteur, post-hoc de Tukey. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

Il semblerait donc que l' $\alpha$ syn A53T n'induit pas de toxicité par rapport à l' $\alpha$ syn WT dans notre modèle, et qu'il n'y ait pas d'effet non plus de la co-expression de  $\Delta$ LRRK2 sur les paramètres étudiés, que ce soit en conditions « basales » ou en présence d'un stress mitochondrial aigu ou chronique.

#### E. Effet de l' $\alpha$ syn et de $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et le taux d'ATP après un stress mitochondrial chronique, dans des cellules cultivées dans du BrainPhys™

En 2015, Bardy et collaborateurs ont montré que des neurones humains dérivés d'iPS avaient une fonctionnalité neuronale altérée lorsqu'ils étaient cultivés dans du milieu Neurobasal. Ils ont donc développé un nouveau milieu de culture, le BrainPhys™, qui permet d'augmenter la fonction neuronale synaptique (Bardy et al. 2015). Ils ont également confirmé que ce milieu permettait bien aux neurones primaires de rat de développer des réseaux neuronaux actifs. L' $\alpha$ syn est une protéine pré-synaptique, et jouerait notamment un rôle dans la transmission synaptique. Une faible activité électrique des neurones cultivés dans du neurobasal pourrait donc expliquer le faible effet de l' $\alpha$ syn, mais aussi de  $\Delta$ LRRK2, car l'absence d'activité neuronale pourrait empêcher des mécanismes nécessaires à la pathologie. Nous avons donc décidé de changer notre milieu de culture (N+B27) pour du BrainPhys™, afin de nous placer dans des conditions plus physiologiques (concentration en glucose et osmolarité).

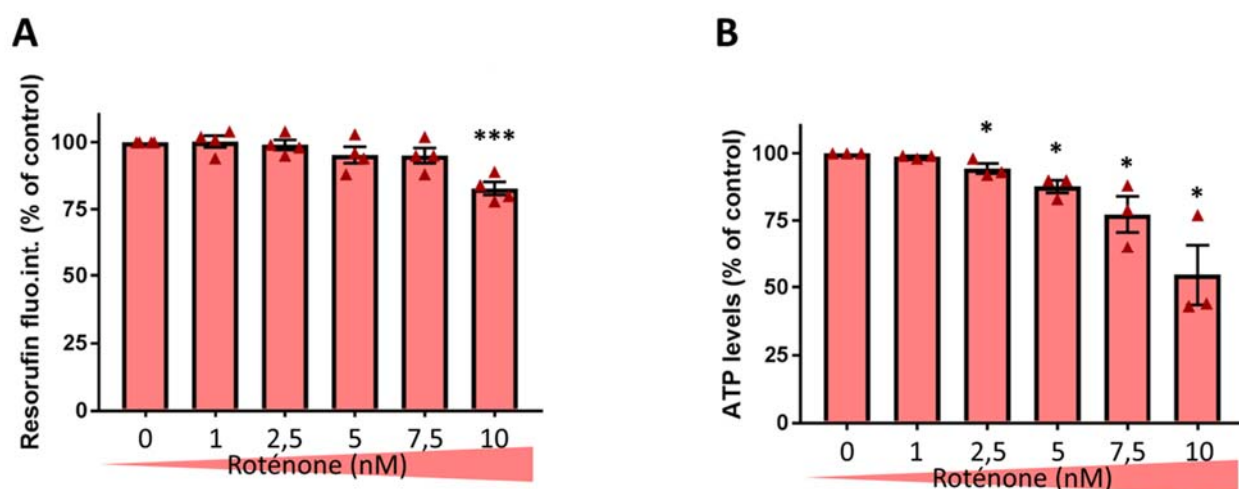
Tout d'abord, nous avons vérifié que les LV permettaient également une bonne expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 en BrainPhys™, et en effet l'expression et la localisation de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 n'étaient pas modifiées par le BrainPhys™ (Figure 36).



**Figure 36. Expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 dans les neurones primaires cultivés avec du BrainPhys™.** Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduits à 1 DIV avec des LV codant pour l' $\alpha$ syn A53T et pour  $\Delta$ LRRK2 WT, G2019S ou DK, et LacZ comme contrôle. A 5 et 8 DIV, la moitié du milieu a été remplacée par du BrainPhys™. A 14 DIV, les cellules ont été fixées et immunomarquées avec des anticorps reconnaissant l' $\alpha$ syn et HA (pour  $\Delta$ LRRK2), afin de vérifier leur localisation cellulaire. Images représentatives prises au microscope confocal. Grossissement 40X.

Nous avons ensuite repris l'approche du traitement chronique à la roténone, car cette approche nous semblait être la plus pertinente dans le contexte de l'étude d'une maladie chronique. Nous avons réalisé une nouvelle étude en dose réponse avec la roténone, afin vérifier si le nouveau milieu de culture modifiait la sensibilité des neurones à cette toxine. Avec le milieu N+B27, il n'y avait pas d'effet des doses jusqu'à 3nM sur la quantité d'ATP, puis une chute à la dose de 10nM (Figure 34A, B). Nous avons donc cette fois-ci choisi des concentrations permettant de couvrir cet intervalle. Pour des raisons techniques, nous avons également dû diminuer le nombre de traitements à 3. En effet, le BrainPhys™ nécessite de changer la moitié du milieu de culture deux fois, à 5 et à 8 DIV. Nous avons donc couplé les traitements à ces changements de milieu afin de bien maîtriser au mieux la concentration de roténone ajoutée aux cultures.

L'exposition des neurones primaires à des concentrations croissantes de roténone induisait une diminution dose-dépendante, à la fois de la viabilité cellulaire (Figure 37A) et du taux d'ATP (Figure 37B). Nous avons donc décidé d'utiliser deux doses différentes sur les cultures co-transduites : la dose de 7,5nM, induisant peu de mort cellulaire (~5%) et une diminution d'environ 30% de l'ATP, et la dose de 10nM, plus toxique (~15% de mort cellulaire et ~45% de perte en ATP).

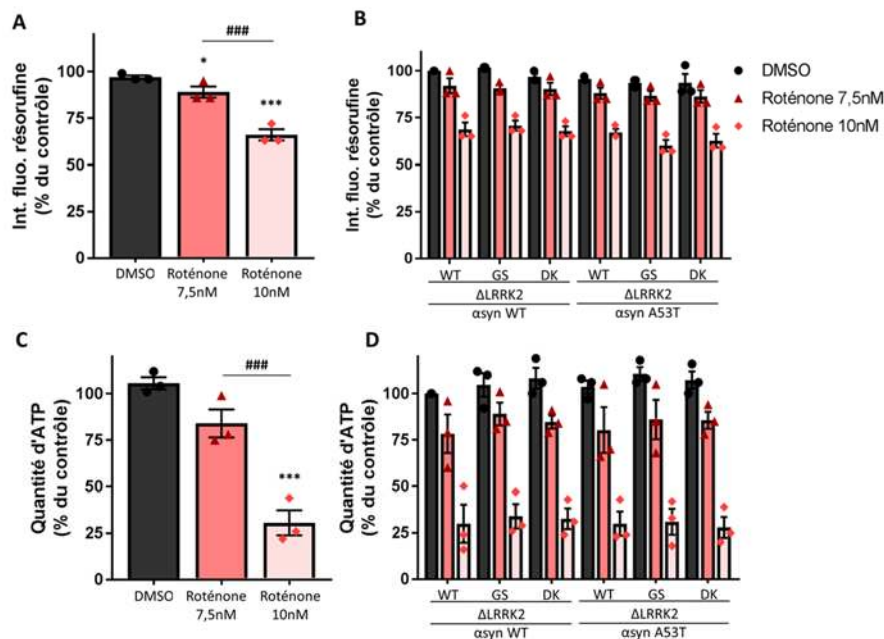


**Figure 37. Mise au point du traitement chronique à la roténone pour des cellules cultivées avec du BrainPhys™.** Des neurones primaires de cortex de rats cultivés dans du BrainPhys™ ont été traités à 4, 8 et 11 DIV avec des doses croissantes de roténone diluée dans du DMSO. (A) A 14 DIV, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=10, N=4. \*\*\* p<0,001 par rapport au contrôle. ANOVA à 1 facteur, post-hoc de Tukey. (B) La quantité d'ATP a été évaluée par le test CellTiter-Glo® 2. n=10, N=3. \* p<0,05 par rapport au contrôle, test de Mann-Whitney. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

De la même manière que pour les expériences précédentes, nous nous sommes donc posé la question de savoir si l'expression de l' $\alpha$ syn A53T augmentait la sensibilité des cellules à un stress mitochondrial chronique par rapport à l' $\alpha$ syn WT, et si  $\Delta$ LRRK2 modulait cet effet.

Nous avons tout d'abord pu constater que les cellules transduites répondaient bien à la roténone. En effet, les cellules co-transduites présentaient en moyenne une diminution de 10% de la viabilité cellulaire et de 15% de l'ATP après une exposition chronique à 7,5nM de roténone (Figure 38A, C). Ces diminutions étaient d'environ 35% et 70% pour la viabilité cellulaire et l'ATP respectivement, après une exposition chronique des cellules à 10nM de roténone (Figure 38A, C).

L'étude plus en détail de l'effet de l'expression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire (Figure 38B) et le taux d'ATP (Figure 38D) n'a cependant pas permis de révéler de toxicité de l' $\alpha$ syn A53T par rapport à l' $\alpha$ syn WT, ni d'effet de la co-expression de  $\Delta$ LRRK2.



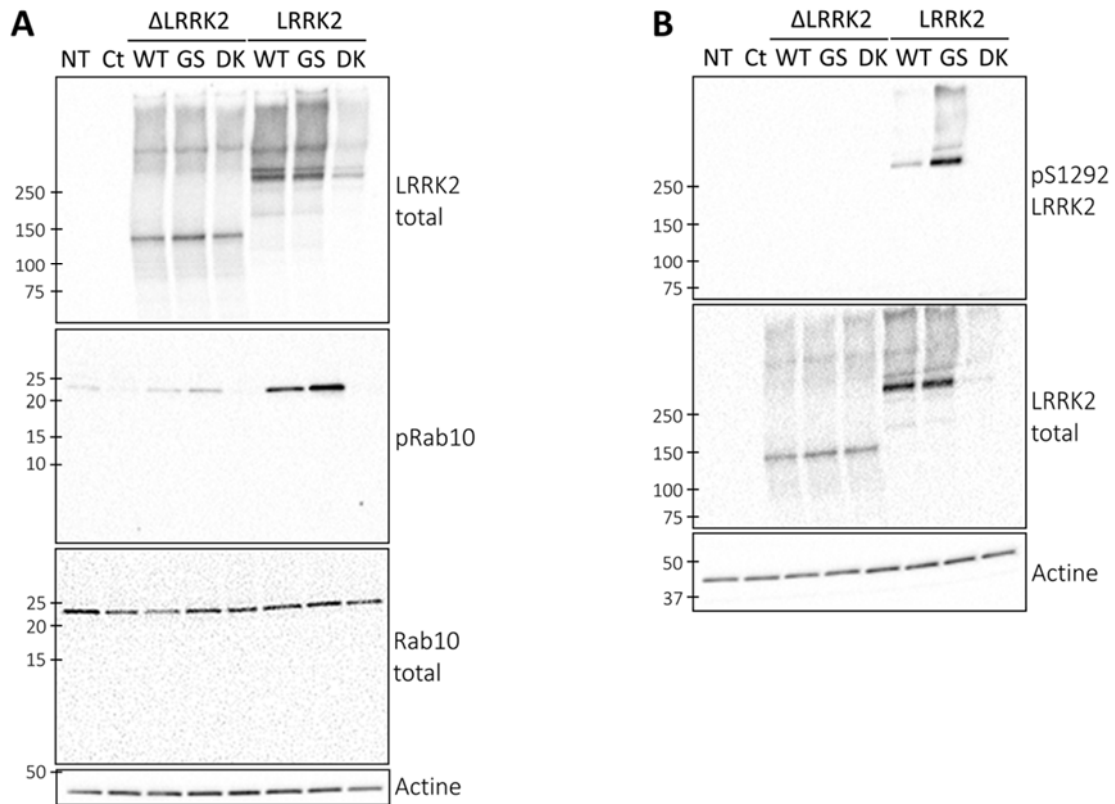
**Figure 38. Effet de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur la viabilité cellulaire et la bioénergétique mitochondriale, avec ou sans traitement chronique à la roténone, dans des cellules cultivées avec du BrainPhys™.** Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduits à 1 DIV avec des LV codant pour l' $\alpha$ syn WT/A53T et pour  $\Delta$ LRRK2 WT, G2019S ou DK. A 5 et 8 DIV, la moitié du milieu a été remplacée par du BrainPhys™. Ils ont ensuite été traités 3 fois avec 7,5 ou 10nM de roténone ou le véhicule comme contrôle (A,B) A 14 DIV, la viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente. n=8, N=3. (A) Comparaison de la viabilité cellulaire moyenne (toutes conditions confondues) des cellules traitées avec celle des cellules non traitées. (B) Variation de la viabilité cellulaire des cellules traitées ou non traitées en fonction des différentes conditions de co-transduction. (C) Comparaison du taux d'ATP moyens (toutes conditions confondues) des cellules traitées avec ceux des cellules non traitées. n=8, N=3. (D) Variation du taux d'ATP des cellules traitées ou non traitées en fonction des différentes conditions de co-transduction. \*\*\* p<0,001 par rapport au contrôle. ### p<0,001 par rapport à la dose de 7,5nM de roténone. ANOVA à 1 facteur, post-hoc de Tukey. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

## F. Comparaison de $\Delta$ LRRK2 et de LRRK2

Notre objectif était d'étudier *in vitro* le mécanisme de l'interaction fonctionnelle observée entre l'asyn A53T et  $\Delta$ LRRK2 G2019S chez le rat (Cresto et al. En préparation). Aucune des études que nous avons réalisées ne nous a permis d'observer un quelconque effet de la co-expression des différentes formes de  $\Delta$ LRRK2 sur la toxicité de l'asyn. Le fait de travailler avec des LV nous offrait l'opportunité d'étudier *in vitro* l'effet de la protéine LRRK2 entière, car il est possible d'y insérer des fragments d'ADN de grande taille, par rapport aux AAV utilisés dans les études *in vivo*. Nous avons donc construit des plasmides codant pour la protéine LRRK2 entière (WT, G2019S ou DK). Nous avons transfecté des HEK avec ces plasmides ou avec ceux codant pour les différentes formes de  $\Delta$ LRRK2, puis réalisé un western blot sur les extraits protéiques totaux afin de comparer l'expression du fragment avec celle de la protéine entière. Nous avons ainsi remarqué que, si les 3 formes de  $\Delta$ LRRK2 ont le même niveau d'expression, il y avait des différences entre les différentes formes de la protéine entière. En effet, LRRK2 DK s'exprimait moins que LRRK2 WT et G2019S (Figure 39A, partie supérieure). Nous avons également évalué différents indicateurs de l'activité kinase de LRRK2. La S935 n'est pas présente sur  $\Delta$ LRRK2, donc nous n'avons pas utilisé ce paramètre pour comparer l'activité du fragment et celle de la protéine entière. Par contre, comme il a été expliqué dans la partie II, le fragment a été optimisé afin de contenir la S1292. Nous avons donc évalué par western blot la phosphorylation sur ce résidu. Nous avons ainsi pu constater que LRRK2 était phosphorylé en ce site d'une manière proportionnelle à son activité kinase. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence de phosphorylation de la S1292 de  $\Delta$ LRRK2 (Figure 39B, partie supérieure). Nous avons également évalué la phosphorylation de Rab10, un substrat avéré de LRRK2. En présence de LRRK2 WT, nous avons bien pu détecter ce substrat phosphorylé. Cette phosphorylation était augmentée avec la mutation G2019S, et fortement diminuée avec la forme DK de LRRK2. pRab10 était aussi faiblement augmenté avec  $\Delta$ LRRK2 G2019S, bien qu'à un niveau beaucoup plus faible qu'avec la protéine LRRK2 entière, et il était aboli avec la forme DK de  $\Delta$ LRRK2 (Figure 39A). Il semblerait donc qu'à la fois  $\Delta$ LRRK2 et LRRK2 soient capables de phosphoryler Rab10. Cependant,  $\Delta$ LRRK2 est moins efficace que LRRK2.

Ces données ont confirmé que nos constructions permettaient l'expression d'une protéine LRRK2 présentant une activité kinase modulée par les mutations G2019S et G2019S/D1994A. La suite des expériences a donc été réalisée avec ces constructions et nous avons rédigé une publication à partir de ces résultats.



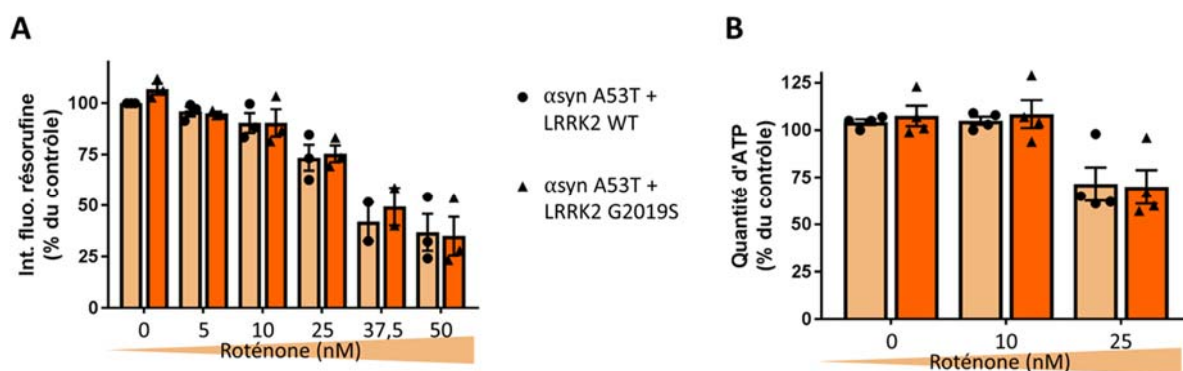


**Figure 39. Comparaison de  $\Delta$ LRRK2 et LRRK2 dans des cellules HEK.** (A,B) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour un pcDNA (Ct) comme contrôle, ou les formes WT, G2019S ou DK de  $\Delta$ LRRK2 ou de LRRK2. Les protéines totales ont été extraites 48h plus tard. NT = non transfecté. Western blot représentatifs montrant (A) l'expression de  $\Delta$ LRRK2/LRRK2 totales, la phosphorylation de Rab10 et l'expression de Rab totale, (B) la phosphorylation de la S1292 de  $\Delta$ LRRK2/LRRK2 par rapport à l'expression de la protéine totale, avec l'actine comme contrôle de charge. N=2.



### G. Effet de l'αsyn et de LRRK2 entière sur la viabilité cellulaire et le taux d'ATP après un stress mitochondrial aigu

Nous n'avons pas vu de différence dans l'effet de l'αsyn et de ΔLRRK2 en présence d'une sensibilisation par une toxine mitochondriale, mais il est possible que cela soit dû à l'absence de toxicité de ΔLRRK2 *in vitro*. Nous avons donc réalisé une étude pilote sur des cellules à 13 DIV co-exprimant l'αsyn A53T et LRRK2 WT ou G2019S entière, que nous avons traitées avec des doses croissantes de roténone pendant 24h, puis nous avons mesuré la viabilité cellulaire par un test à la résazurine et le taux d'ATP. Si la roténone induisait bien une diminution dose-dépendante de ces deux paramètres, nous n'avons en revanche pas observé de différence de sensibilité entre les cellules co-exprimant l'αsyn A53T avec LRRK2 WT ou G2019S (Figure 40A, B).



**Figure 40.** Effet de la co-expression de l'αsyn A53T et LRRK2 sur la sensibilité aiguë à des doses croissantes de roténone. Des neurones primaires de cortex de rat ont été co-transduits à 1 DIV avec des LV codant pour l'αsyn A53T et pour LRRK2 WT ou G2019S. A 5 et 8 DIV, la moitié du milieu a été remplacée par du BrainPhys™. A 13 DIV, elles ont été traitées avec des doses croissantes de roténone ou de véhicule comme contrôle. A 14 DIV, après 24h de traitement, (A) la viabilité cellulaire (n=5, N=3) et (B) le t'aux d'ATP (n=6, N=4) ont été évalués en mesurant la transformation de résazurine en résorufine fluorescente et avec le test CellTiter-Glo® 2, respectivement. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SEM.

## II. Article 3 : Le mutant G2019S de LRRK2 augmente la phosphorylation de l'αsyn dans des neurones primaires, sans induire de toxicité mitochondriale marquée

### A. Objectifs et synthèse de l'article

Nous avons donc montré que le fragment C-ter de LRRK2 n'avait pas d'effet sur la toxicité de l'αsyn *in vitro*, dans des cultures primaires de neurones. Nos études biochimiques ne nous ont pas permis de montrer de phosphorylation de la S1292 de ΔLRRK2, et seulement une très faible phosphorylation du substrat Rab10 en présence de ΔLRRK2 G2019S, par rapport à la protéine entière. Nous avons donc postulé que, si le fragment C-ter de LRRK2 était suffisant pour observer une toxicité de la mutation G2019S *in vivo*, *in vitro* l'absence du contexte cérébral et de certains interacteurs pourrait limiter ses effets.

Nous avons donc pris la décision de recommencer notre travail en utilisant la forme entière de LRRK2. Pour cette étude, nous n'avons travaillé qu'avec l'αsyn A53T, car nous n'avons pas vu de différence avec la forme sauvage dans les études précédentes, et afin de diminuer le nombre de conditions différentes et donc d'obtenir un nombre de répliquats plus importants mais aussi de faciliter l'analyse statistique puisqu'il y a moins de conditions à comparer. N'ayant pas observé de différence de sensibilité à la roténone de cellules exprimant l'αsyn A53T avec LRRK2 WT ou LRRK2 G2019S, nous avons fait le choix de nous placer dans les conditions les plus simples possibles, afin de limiter les manipulations des cellules et de ce fait la variabilité. Nous avons continué à cultiver les cellules dans du BrainPhys™ car il nous semblait plus pertinent de travailler dans un contexte le plus physiologique possible, et car ces cultures étaient de très bonne qualité, et plus reproductibles dans ce milieu par rapport à ce que nous avons pu expérimenter avec du N+B27.

De la même manière que précédemment, nous avons donc cherché à évaluer l'effet de l'αsyn sur la mitochondrie, et si cet effet pouvait être modulé par l'activité kinase de LRRK2. Pour cela, nous avons construit 3 plasmides différents. Un permettant l'expression de LRRK2 WT (la forme physiologique), un autre permettant l'expression du mutant pathogène G2019S. Le dernier présente à la fois la mutation G2019S et la mutation D1994A, et permet d'obtenir l'expression d'une protéine sans activité kinase (DK). Après avoir validé dans des cellules HEK, ainsi que dans les cultures primaires neuronales, que ces 3 formes de LRRK2 présentaient une activité kinase modulée par les différentes mutations, nous avons étudié leur impact sur la phosphorylation de l'αsyn dans les neurones. En effet, 90% de l'αsyn retrouvée dans les CL est phosphorylée au niveau de la S129 (Anderson et al. 2006; Fujiwara et al. 2002). Nous avons ainsi pu montrer que l'expression de LRRK2 G2019S augmentait significativement le nombre de neurones contenant de l'αsyn pS129 par rapport aux neurones co-exprimant l'αsyn avec LRRK2 WT ou DK, sans modifier la viabilité cellulaire.

Après avoir validé que l'expression de LRRK2 pouvait moduler la pathologie liée à l'αsyn d'une manière dépendante de son activité kinase, nous avons étudié si cela était associé à un dysfonctionnement mitochondrial. Nous n'avons pas observé de modification du taux d'ATP ni du potentiel de membrane

mitochondrial entre les différentes conditions, ce qui semble indiquer que les mitochondries étaient capables de maintenir leur homéostasie. Cependant, nous avons détecté des différences dans la production d'ATP mitochondrial ainsi que dans la distance moyenne parcourue par les mitochondries dans les prolongements neuronaux lorsque les formes de LRRK2 enzymatiquement actives étaient co-exprimées avec l' $\alpha$ syn A53T.

Il semblerait donc que LRRK2, via son activité kinase, soit capable de moduler la phosphorylation de l' $\alpha$ syn et que la co-expression de ces deux protéines induirait un léger stress mitochondrial dans ces conditions expérimentales, qui serait cependant insuffisant pour induire une mort cellulaire.

## B. Article 3

# G2019S mutant LRRK2 increases $\alpha$ -synuclein phosphorylation in primary neurons without overt mitochondrial toxicity

Camille Gardier<sup>1,2</sup>, Noémie Cresto<sup>1,2</sup>, Marie-Claude Gaillard<sup>1,2</sup>, Noëlle Dufour<sup>1,2</sup>, Alexis-Pierre Bemelmans<sup>1,2</sup>, Emmanuel Brouillet<sup>1,2</sup>, Géraldine Liot<sup>1,2,#</sup>

<sup>1</sup> CEA, DRF, Institut de Biologie François Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRCent), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> CNRS, CEA, Paris-Sud Univ., Univ. Paris-Saclay, Neurodegenerative Diseases Laboratory (UMR9199), F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

# Corresponding author: geraldine.liot@cea.fr

## Abstract

Alpha-synuclein ( $\alpha$ syn) and Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) proteins are likely to play crucial roles both in sporadic and familial forms of Parkinson's disease (PD). The most prevalent mutation in LRRK2 is the G2019S substitution, which induces neurotoxicity through an increase of its kinase activity. It has been suggested that  $\alpha$ syn and LRRK2 could act together to induce the selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in the pathogenesis of this disease. We have previously shown that G2019S LRRK2 could increase the dopaminergic cell loss induced by  $\alpha$ syn in the SNpc of rats, confirming the existence of a functional interaction between the two proteins. Here, we aimed at studying the mechanism of this functional interaction, focusing on mitochondrial dysfunction. We used lentiviral vectors to express A53T  $\alpha$ syn and different LRRK2 variants in primary rat neurons, and showed that G2019S LRRK2, but not the wild type (WT) form nor the dead kinase mutant (DK), significantly increased the number of neurons expressing a pathological form of  $\alpha$ syn (phospho-S129) without inducing any cell loss. At the cellular and molecular levels, there was a significant decrease in the mitochondrial ATP production rate in cells co-expressing LRRK2 (WT, G2019S and even more pronounced with DK) with  $\alpha$ syn, without any change in total ATP levels. The mean distance travelled by mitochondria along neurites was higher in neurons co-expressing  $\alpha$ syn and LRRK2 than in neurons only expressing  $\alpha$ syn. To summarize, we set up an *in vitro* model in which LRRK2 increases the somatic accumulation of a pathologic form of  $\alpha$ syn, in a kinase-dependent manner. In these conditions, mitochondria were able to maintain their homeostasis, in particular by adapting their ATP production rate, which seems to indicate a moderate mitochondrial stress induced by the co-expression of  $\alpha$ syn and LRRK2.

## Keywords

Parkinson's disease  
Leucine-rich repeat kinase 2  
Lentiviral vectors  
Primary neuronal cultures  
Mitochondria

## Abbreviations

<b>αsyn</b>	alpha-synuclein
<b>ANK</b>	Ankyrine
<b>ARM</b>	Armadillo
<b>ATP</b>	Adenosine TriPhosphate
<b>COR</b>	C-terminal of ROC
<b>DA</b>	Dopaminergic
<b>DIV</b>	Days In Vitro
<b>DK</b>	Dead Kinase
<b>DRP1</b>	Dynamin-Related Protein 1
<b>HBSS + HEPES</b>	Hank's Balanced Salt Solution supplemented with 10mM HEPES
<b>IF</b>	Immuno-fluorescence
<b>KIN</b>	Kinase
<b>LB</b>	Lewy Bodies
<b>LN</b>	Lewy Neurites
<b>LRR</b>	Leucine-Rich Repeat
<b>LRRK2</b>	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
<b>LV</b>	Lentivirus
<b>Mfn2</b>	Mitofusin 2
<b>N+B27</b>	Neurobasal™ medium supplemented with 2% B27 , 1% penicillin/streptomycin and 1% GlutaMax
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PBS-T</b>	Phosphate Buffer Saline with 0,1% Triton™ X-100
<b>PD</b>	Parkinson's disease
<b>PLL</b>	Poly-L-Lysine
<b>ROC</b>	Ras-of-complex protein
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SNpc</b>	Substantia Nigra <i>pars compacta</i>
<b>TBS-T</b>	Tris Buffer Saline with 0,1% Tween 20
<b>WB</b>	Western blot
<b>WT</b>	Wild Type

## Introduction

Parkinson's Disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder after Alzheimer's Disease, with around 5 million people affected worldwide (Dorsey et al., 2007). It is a multifactorial disease, which most likely results from a complex interaction between both genetic and environmental factors. It is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) and the formation of Lewy Bodies (LB) and Lewy Neurites (LN) composed of many elements, including fragmented membranes, organelles and vesicles, as well as the pre-synaptic protein  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ syn) (Shahmoradian et al., 2019; Spillantini et al., 1997).  $\alpha$ syn is a 140 amino acids protein especially involved in vesicular trafficking and neurotransmitter release (reviewed in Bendor et al., 2013). In the normal brain, only around 4% of  $\alpha$ syn is phosphorylated at its serine 129 (Ser129), whereas it goes up to around 90% in LB (Anderson et al., 2006; Fujiwara et al., 2002).

PD is mostly a sporadic disease, but approximately 5% of the cases can be linked to a genetic cause, and at least 16 loci and 11 genes have been associated with PD (reviewed in Poewe et al., 2017). Mutated genes can be transmitted in an autosomal dominant or recessive manner. The first mutated gene to be identified in familial PD was *SNCA*, which encodes  $\alpha$ syn (Polymeropoulos et al., 1997). Different substitutions (such as A30P, E46K, A53T) or the duplication or triplication of *SNCA* have since been linked to genetic forms of PD (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004; Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003). Even though it is extremely rare, the A53T  $\alpha$ syn mutant is often used to study PD because of its accelerated toxicity compared to WT  $\alpha$ syn.

Another gene, *LRRK2*, is found mutated very frequently in PD. It codes for the Leucine-Rich Repeat Kinase 2 protein (LRRK2). LRRK2 is a 2527 amino acids protein that has both a kinase and a GTPase domain, flanked by protein-protein interaction domains (Fig. 1A). It is thought to play a role in autophagy, as well as in synaptic vesicles trafficking and cytoskeleton dynamics (reviewed in Roosen and Cookson, 2016). The G2019S mutation, situated in the activation loop of the kinase domain, is the most frequent genetic cause of PD and is also found in 1% of sporadic PD cases (Gilks et al., 2005). It induces a 2-3 fold increase in LRRK2's kinase activity (Anand et al., 2009; Greggio et al., 2006; West et al., 2005) that has been found to be toxic *in vitro* (Greggio et al., 2006; MacLeod et al., 2006; Smith et al., 2005, 2006) as well as *in vivo* (Dusonchet et al., 2011; Lee et al., 2010). Their phosphorylation is not increased by the G2019S mutation (Li et al., 2011; Nichols et al., 2010), but quite surprisingly they are significantly decreased by the inhibition of LRRK2's kinase activity (Vancraenenbroeck et al., 2014). On the contrary, the autophosphorylation site S1292, at the end of the LRR domain, is well correlated with LRRK2's kinase activity and this has been confirmed *in vivo* (Longo et al., 2017; Sheng et al., 2012). LRRK2 has also been shown to phosphorylate a subset of Rab GTPases (Steger et al., 2016). Especially, the phosphorylation of Rab10 directly correlates with LRRK2's kinase activity and is used as a marker

of the latter (Fan et al., 2018). It has recently been shown that LRRK2 was activated in the SNpc of sporadic PD patients (increased pSer1292 and pRab10), highlighting that LRRK2 may play a general role in PD pathogenesis, including sporadic cases (Di Maio et al., 2018).

The discovery in 2009 that G2019S LRRK2 increased the cell loss induced by A53T  $\alpha$ syn in the striatum (ST) of CAMKII tet-off inducible double transgenic mice first suggested that LRRK2 could modulate  $\alpha$ syn's toxicity through its kinase activity (Lin et al., 2009). This was confirmed by Dawson's team in 2017, who showed an increased aggregation of endogenous  $\alpha$ syn in CAMKII tet-off inducible transgenic mice overexpressing G2019S LRRK2, but not in mice overexpressing a dead kinase (DK) mutant of LRRK2 (Xiong et al., 2017). Similarly, the AAV-mediated overexpression of human  $\alpha$ syn (WT or A53T) in the SNpc induced significantly more dopaminergic cells loss in transgenic G2019S LRRK2 mice than in WT mice, and this effect was prevented by the pharmacological inhibition of LRRK2's kinase activity (Daher et al., 2015; Novello et al., 2018). Even if some papers do not corroborate this hypothesis (Daher et al., 2012; Herzig et al., 2012), it still seems highly probable that the modulation of LRRK2's kinase activity could impact  $\alpha$ syn-induced pathology.

Mitochondria have been extensively studied in the context of PD since the discovery that the selective chemical inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I could induce parkinsonian syndromes in exposed people (Langston and Ballard, 1983; Langston et al., 1984). This was followed by the post-mortem description of a selective deficit in this same complex in the ST (Mizuno et al., 1989) and SNpc (Schapira et al., 1990) of PD patients. Exogenous or endogenous  $\alpha$ syn can partially be localized to mitochondria in rodents (Chinta et al., 2010; Li et al., 2007; Martin et al., 2006; Nakamura et al., 2008; Subramaniam et al., 2014; Zhang et al., 2008) and could interact with the outer mitochondrial membrane translocase TOM20 to inhibit mitochondrial protein import (Di Maio et al., 2016). *In vitro*, about 10% of LRRK2 was found in the mitochondrial enriched protein fraction (West et al., 2005). Independently,  $\alpha$ syn and LRRK2 have been shown to alter mitochondrial homeostasis, through a yet unknown mechanism, even though numerous articles pointed towards potential effects on the mitochondrial respiratory chain and/or on the fusion/fission equilibrium (reviewed in Cresto et al., 2019). Lin and collaborators have shown an increased proportion of dense mitochondria with widened cristae in double transgenic A53T  $\alpha$ syn/G2019S LRRK2 mice as well as a surplus of mitochondrial superoxide release to the matrix compared to A53T  $\alpha$ syn mice (Lin et al., 2009). In primary astrocytes of G2019S LRRK2 transgenic mice exposed to recombinant  $\alpha$ syn, an increase in the number of fragmented mitochondria, in mitochondrial ROS levels and a decrease in mitochondrial membrane potential compared to non-transgenic astrocytes have been described (Lee et al., 2019). Overall, the literature suggests that both  $\alpha$ syn and LRRK2 could affect mitochondrial bioenergetics and/or mitochondrial dynamics but the data concerning the effect of the functional interaction of both protein on mitochondria are scarce.

Therefore, we investigated how LRRK2 can modulate  $\alpha$ syn pathology in primary rat neurons. For this purpose, we infected the neurons with lentiviruses to express A53T  $\alpha$ syn and 3 different forms of LRRK2: WT, G2019S, or the dead kinase (DK) mutant G2019S/D1994A. We found that G2019S LRRK2 increased the number

of positive neurons for pS129  $\alpha$ syn and that the co-expression of LRRK2 and  $\alpha$ syn disrupted mitochondrial energy metabolism.

## **Materials and methods**

### HEK 293T cells and transfection

HEK293T cells were cultured in Dubelcco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2mM of glutamine. Cells were grown in an incubator at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. HEK 293T cells were plated at a density of 350,000 cells/well in 6-well plates. When cells reached 30-40% confluence, they were transfected by the calcium phosphate method with 4 $\mu$ g of DNA. Cells were lysed 48h after transfection to ensure optimal protein expression.

### Lentiviral vectors production

Lentiviral vectors were produced in HEK 293T cells, using a four-plasmid system, as previously described (Hottinger et al., 2000). The HIV-1 vectors were pseudotyped with the VSV-G protein. Viruses were concentrated by ultracentrifugation, then resuspended in phosphate-buffer saline (PBS) with 1% bovine serum albumin (BSA). The viral particle content of each batch was determined by p24 antigen enzyme-linked immunosorbent assay (RETROtek; Gentaur). The stocks were kept at -80°C until use.

### Primary neuronal cultures and transduction

The procedures were performed in accordance with the French regulations (EU Directive 86/609 – French Act Rural Code R 214-87 to 131).

Timed-pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River. At 17 days of gestation, animals were deeply anesthetized with isoflurane, then killed with a lethal dose of pentobarbital. The embryos were quickly removed and cortices were dissected in cold Hank's Balanced Salt Solution supplemented with 10mM HEPES (HBSS + HEPES). Tissue digestion was performed during 10min at 37°C in a solution of trypsin (0.025% in HBSS + HEPES). The trypsin was inactivated by addition of 1mL of FBS. After 3 washes in 5mL of HBSS + HEPES, cortices were mechanically dissociated via 10 up-and-down movements.

Dissociated cortical neurons were counted with a LUNA cell counter (Logos Biosystems) and plated in Neurobasal™ medium (ThermoFisher) supplemented with 2% B27 (ThermoFisher), 1% penicillin/streptomycin (ThermoFisher) and 1% GlutaMax (ThermoFisher) (N + B27) on culture plates coated with poly-L-lysine (PLL) (Sigma) at 1 mg/ml. Cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At 5 Days In Vitro (DIV) and 8 DIV, half of the medium was replaced with BrainPhys™ medium (Stem Cell Technologies) supplemented with 2% SM1 (Stem Cell Technologies) (Bardy et al., 2015)



Density of plating was: 1,000,000/ well for 6 well plates, 500,000 / well for 12 well plates, 250,000 / well for 24 well plates, 60,000 / well for 96 well plates, 250,000 / well for 8 well Ibidi chambers and 17,500 / well for seahorse plates.

For mitochondrial morphology analyzes, 5 millions of cells in suspension were electroporated with 2 $\mu$ g of DsRed2-Mito plasmid with the rat cortical neuron Neurcleofector<sup>®</sup> kit according to the instructions supplied (Lonza). Electroporated cells were diluted with non-electroporated cells (1:3) before plating on PLL coated culture plates. The totality of the medium was changed 3h after plating with fresh N + B27. The cells were then maintained as described above.

Lentiviral transduction: at 1 DIV, cells were infected with LV-PGK-nls-LacZ (30ng/100,000 cells) as a control or co-infected with LV-CBA- $\alpha$ syn A53T (10ng/100,000 cells) + LV-PGK-nls-LacZ (20ng/100,000 cells) or LV-CBA-GFP (20ng/100,000 cells) or LV-CBA- $\alpha$ syn A53T (10ng/100,000 cells) + LV-CBA-LRRK2 (20ng/100,000 cells). At 4 DIV, the medium was replaced with fresh N + B27. The cells were then maintained as described above.

This choice of cortical over midbrain cultures was motivated by the low proportion of dopaminergic neurons in the midbrain, ending up in only 10 to 20% of cultured midbrain neurons being positive for TH (Gaven et al., 2014). This low proportion of dopaminergic neurons in these cultures makes it difficult to really study molecular mechanisms related to the dopaminergic environment. Moreover, other brain regions and neuronal subtypes, other than DA neurons, are affected in PD. Notably, the cortex develops LB during the late stages of the disease according to the Braak hypothesis (Braak et al., 2003). Together with the fact that cortical cultures are more homogenous and more reproducible, these arguments led us to the decision to work in primary rat cortical neurons.

#### Immunocytochemistry

At 14 DIV, cells on glass coverslips were fixed with 3.7% formaldehyde + 5% sucrose for 20min, then washed twice with PBS. Fixed cells were incubated in a blocking buffer (PBS + 0.1% Triton<sup>™</sup> X-100 (PBS-T) + 3% NGS) for 30min at room temperature (RT). Glass coverslips were incubated for 2h at RT with the indicated primary antibodies (see table 1 for details about the different antibodies used) in the blocking buffer followed by 3 washes in PBS-T. They were then incubated in alexa fluorochrome-conjugated secondary antibodies (1/1000) prepared in the blocking buffer for 1h at RT. After three washes in PBS, coverslips mounted in Mowiol<sup>®</sup>. Images were acquired with a laser confocal microscope (SP8, Leica) and analysis was performed using the ImageJ software.

## Western-Blots

At 14 DIV, cells were washed once in cold PBS, and proteins were extracted in a lysis buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma), 1% phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma-Aldrich), and 1mM PMSF]. The homogenates were centrifuged at 15,000g for 10min at 4°C, and the supernatants were collected. Protein levels were determined with the BCA kit (ThermoFisher). 20 µg of total protein extract were separated onto 4-20% TGX pre-casted SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad). Transfert was performed onto a nitrocellulose membrane in 10 minutes with the Trans-Blot® turbo transfert system (Bio-Rad). The exact same protocol was used with HEK293T cells, except that proteins were extracted with a buffer containing 1% Triton-X 100 instead of NP40. Membranes were then blocked for 1h in TBS + 0,1% Tween 20 (TBS-T) + 5% non-fat dry milk at RT, and then incubated overnight at 4°C with the indicated antibodies (see table1). After 3 washes in TBS-T, membranes were incubated for 1h with secondary HRP-conjugated antibodies raised against the corresponding species of the primary antibodies (see table1). Membranes were then washed 3 times in TBS-T and incubated with ECL reagent (Clarity Western ECL Substrate, Biorad), according to the supplier's instructions. Proteins were detected with the Chemidoc system (Bio-Rad). Quantifications were done using the Image Lab software (Biorad).

Table 1. List of all antibodies used in IF and WB. Rb = rabbit, Ms = mouse.

Antibody	Ref	Species	Dilution for WB	Dilution for IF
Actin	A2066 (Sigma)	Rb	1/3000	X
pS129 αsyn	AB51253 (Abcam)	Rb	1/1000	1/200
Asyn	807804 (Biolegend)	Ms	1/1000	1/200
pS616 DRP1	4494 (Cell Signaling)	Rb	1/1000	X
DRP1	611112 (BD)	Ms	1/1000	X
Fis1	ALX-210- 1037 (Enzo)	Rb	1/250	X
pS953 LRRK2	AB133450 (Abcam)	Rb	1/1000	X

pS1292 LRRK2	AB203181 (Abcam)	Rb	1/1000	X
LRRK2	13046 (Cell Signaling)	Rb	1/1000	1/200
MAP2	4403 (Sigma)	Ms	X	1/200
Mfn2	9482 (Cell Signaling)	Rb	1/1000	X
NeuN- Alexa Fluor 488 Conjugated	MAB377X (Chemicon)	X	X	1/500
Anti-Ms IgG alexa Fluor 488	A11001 (ThermoFisher)	Goat	X	1/1000
Anti-Rb IgG alexa 488	A11008 (ThermoFisher)	Goat	X	1/1000
Anti-Rb IgG alexa 555	A21428 (ThermoFisher)	Goat	X	1/1000
Anti-Ms IgG alexa 594	A11005 (ThermoFisher)	Goat	X	1/1000
Anti-Ms IgG alexa 633	A21050 (ThermoFisher)	Goat	X	1/1000
HRP conjugated-anti Ms	A16011 (ThermoFisher)	Donkey	1/5000	X
HRP conjugated-anti Rb	A16023 (ThermoFisher)	Donkey	1/5000	X

#### Cell viability, ATP levels and mitochondrial membrane potential

Cells were plated on white wall (for ATP levels) or black wall 96 well plates. To measure cell viability at 14 DIV, resazurin (Sigma) was added to the media and after 2h of incubation, fluorescent signal was quantified using a microplate reader (Safas),  $\lambda_{ex} = 560\text{nm}$  and  $\lambda_{em} = 590\text{nm}$ .

Total ATP levels were measured with the CellTiter-Glo® 2.0 assay (Promega). 100µL of reagent was added to each well and the plate was immediately placed on an orbital shaker for 2min to induce cell lysis. The luminescent signal was measured with a luminometer (Glomax, Promega) after 10min of incubation at RT (integration time of 1s per well).

Mitochondrial membrane potential was evaluated using the TMRE probe (Sigma). 200nM of TMRE were added per well. After a 30min incubation, cells were washed once in EBSS (Sigma) and fluorescent signal was quantified using a microplate reader (Safas),  $\lambda_{ex} = 540\text{nm}$  and  $\lambda_{em} = 595\text{nm}$ .

#### Cellular respiration and Real-Time ATP rate Assay

On the day prior to the assay, the sensor cartridge was hydrated overnight in XF calibrant solution (Agilent), at 37°C. On the day of the assay, cell culture medium was replaced with pre-warmed homemade artificial Cerebrospinal Fluid (aCSF), according to the manufacturer's instructions (120mM NaCl, 3.5mM KCl, 1.3mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES, 10 mM glucose, 10 mM sodium pyruvate, pH 7.4), and the cells were incubated at 37°C without CO<sub>2</sub> for 1h. Reagents provided in the XFp Cell Mito Stress Kit (Agilent) were resuspended and diluted to the appropriate concentrations in aCSF. Oxygen Consumption Rate (OCR) was measured at 37°C using a Seahorse XFp Analyzer (Agilent). Three baseline measurements of OCR were taken before the injection of mitochondrial modulators. The modulators used were (in chronological order) 1.5µM oligomycin, 1µM FCCP and 0.5µM rotenone/antimycin A. Three measurements were performed for each drug. At the end of the experiment, cells were washed in PBS and proteins were extracted using a buffer containing 50mM of Tris and 2% of SDS. The quantity of protein in each well was then measured via the Qubit Protein Assay (ThermoFisher) and used to normalize to OCR data.

For the ATP Rate Assay (Agilent), the medium was changed again just before starting the measurements, and only oligomycin (1.5µM) and rotenone/antimycin (0.5µM) were injected into the wells. Like for the respiration assay, values were normalized by the quantity of proteins present in each well. The mito and glyco ATP production rates were then calculated using the Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay Report Generator (Agilent).

#### Time-lapse imaging

For time-lapse imaging, DsRed2-mito electroporated neurons were plated on 8-wells ibidi® chambered coverslips coated with PLL, and transduced with the appropriate lentiviruses the next day. At 4-5 DIV, time lapse movies were acquired with a 63X oil-immersion objective on an inverted Zeiss microscope equipped with a heated chamber at 37°C and a system to maintain 5% CO<sub>2</sub> on the cultures. Microscope was operated by the Morpho Strider software interface (ExploraNova). Individual neurons were imaged for 2min with a 5sec interval. Ten neurons were imaged per condition, in proximity to the soma to be able to distinguish between retrograde and anterograde movements. Maximal projections was performed to identify the mitochondria's'

paths. Kymographs were generated from the movies with the “KymoToolBox” ImageJ plugin (Zala et al., 2013) to allow for visualization of mobile and stationary tracks. Kymographs were then analysed manually by drawing the mitochondria’s trajectory. The plugin extracted the dynamic parameters directly from the trajectories. All transport related parameters were calculated over the whole duration of each movie but by taking into account only mitochondria that were actually moving were analysed. Cut off was set at the speed of 0.01 $\mu$ m/s.

### Statistical analysis

All data are expressed as mean $\pm$  standard error of the mean (SEM). Normality of data distribution was tested using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance was tested with Levene’s test using the commercially available software (Statistica, 13.0). All variables expressed in percentage (P) were transformed in  $Q = \arcsin(\sqrt{P}/100)$  and statistical analysis was performed on the Q variable. When normality and homogeneity of variance were met (on raw or transformed data), one-way ANOVA was carried out, with Fisher’s post hoc test. In the cases where assumption of normality and/or homogeneity of variance were not met, non-parametric tests were applied: Mann-Whitney and Kruskal-Wallis for comparison of two and more groups, respectively.

## Results

### LRRK2 is functional and enzymatically active in HEK 293T cells.

To study the impact of LRRK2’s kinase activity on  $\alpha$ syn, we generated three different constructs of full length LRRK2. One coding for the WT protein, another for the G2019S pathogenic mutant. The third one encodes a protein with both the G2019S mutation and the D1994A mutation, which blocks LRRK2’s kinase activity by mutation of the conserved aspartic acid residue in the catalytic loop (Greggio et al., 2006; Smith et al., 2006; West et al., 2007). We first checked the level of expression of these three proteins in HEK 293T cells by western blot (Fig. 1B, D upper panels). We obtained a robust expression of both WT and G2019S LRRK2 at the expected molecular weight of 286 kDa but DK LRRK2 had a lower level of expression than the other constructs, even though we used the same amount of plasmid. We transfected HEK 293T cells with increasing quantities of the plasmid to verify if DK LRRK2 could be better expressed. We could not obtain an expression level similar to that of the other LRRK2 constructs whatever the quantity of transfected plasmid (data not shown), as if the D1994A mutation somehow affected the expression or processing/stability of LRRK2.

Because the G2019S-induced increase of LRRK2’s kinase activity is thought to be implicated in its toxicity, we assessed the kinase activity of the three LRRK2 constructs in HEK 293T cells total protein extracts by western blot. We looked at its autophosphorylation at S1292, expected to be increased in presence of the G2019S mutation, and its phosphorylation at S935, described to be slightly decreased by the G2019S mutation (Li et al., 2011; Nichols et al., 2010) (Fig. 1B, D). Quantification of the blots was performed and we analyzed

the expression of pS1292 or pS935 relative to total LRRK2 as a loading control (Fig. 1C, E). We observed that the G2019S mutation was associated with a significant increase in pS1292 levels (Fig. 1B, lower panel; Fig. 1C) as well as a decrease of pS935 levels compared to WT LRRK2 (Fig. 1D, lower panel; Fig. 1E). On the contrary, the double mutation G2019S/D1994A, which has been shown to decrease LRRK2's kinase activity (DK), significantly decreased both pS1292 and pS935 LRRK2 levels compared to WT and G2019S LRRK2 (Fig. 1B-E). These data confirmed that our constructs led to the expression of a functionally active LRRK2 protein.

#### Lentiviral transduction induces the expression of A53T $\alpha$ syn and an enzymatically active LRRK2 in primary neurons

After confirming that our constructs could induce the expression of a LRRK2 protein with a relevant kinase activity in a cell line, we checked that the co-transduction of primary neurons with lentiviruses coding for A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 led to a good neuronal expression of both proteins. As expected from previous experiments performed in our laboratory, co-transduction with LV led to a majority of neurons expressing both transgenes (Benchoua et al., 2006, 2008). By western-blot, we observed that primary neurons did express both human A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 at the expected molecular weight 13 days post-transduction (14 DIV) (Fig. 2A). As in HEK cells, in neurons WT and G2019S LRRK2 were expressed at a similar level, whereas DK LRRK2 was less abundant, even though the same quantity of lentiviruses was used (20ng/100,000 cells) (Fig. 2A). The general goal of our study being the evaluation of the impact of LRRK2's expression on  $\alpha$ syn's toxicity, we wondered if the level of expression of  $\alpha$ syn would be modified by the co-expression of LRRK2. We did not observe any modulation of A53T  $\alpha$ syn expression when LRRK2 was co-expressed (Fig. 2A).

Next we assessed the co-localization of  $\alpha$ syn and LRRK2 by immunofluorescence using antibodies against human  $\alpha$ syn and LRRK2 and also MAP2 to identify neurons. We observed a partial co-localization of  $\alpha$ syn and LRRK2 in neurons. It is important to point out that  $\alpha$ syn was mainly located in cellular processes whereas LRRK2 rather had a somatic expression (Fig. 2C), which is consistent with what has been described in the literature (Biskup et al., 2006; Maroteaux et al., 1988) and explains the partial co-expression of these 2 proteins.

We then checked that the different LRRK2 constructs led to the expression of a functional protein in primary rat neurons, such as seen in HEK cells, by detecting phosphorylated sites, pS1292 and pS935. We did not detect pS1292 in this model in neurons, consistent with previous reports indicating that the phosphorylation level of this site is known to be quite low (Lobbestael et al., 2013). However, we could detect a clear signal for pS935 (Fig. 2A). Quantification of S935 over total LRRK2 was performed and confirmed the results observed in HEK 293T cells. Indeed, we observed a slight decrease of pS935 with the G2019S mutant compared to WT LRRK2, and a significant decrease with DK LRRK2 compared to the levels of phosphorylation of WT and G2019S LRRK2 (Fig. 2B).

Overall, these results showed that our lentiviral approach led to a robust expression of A53T  $\alpha$ syn and the expression of a LRRK2 protein with a kinase activity that was abolished when the DK mutant was expressed.

#### Effect of LRRK2 on $\alpha$ syn's phosphorylation

In the normal brain, around 4% of  $\alpha$ syn is phosphorylated at its serine 129 (S129), whereas around 90% is phosphorylated in LB in PD patients' brains (Anderson et al., 2006; Fujiwara et al., 2002). Therefore, pS129 is often used as a marker of  $\alpha$ syn pathology. In our model, we used a human  $\alpha$ syn antibody and a pS129  $\alpha$ syn antibody to assess by immunofluorescence the levels of total and phosphorylated  $\alpha$ syn respectively. In neurons expressing A53T  $\alpha$ syn, we observed a diffuse somatic staining of pS129 with only few neurites stained. On the contrary, total human  $\alpha$ syn staining had a more neuritic localization with only few cell bodies stained. We did not detect any  $\alpha$ syn aggregates (Fig. 3A). We co-stained the cells with a NeuN antibody to identify neurons and selectively count the number of neurons presenting a pS129 staining. We observed that the co-expression of WT LRRK2 had no effect on the quantity of pS129  $\alpha$ syn-positive neurons compared to neurons expressing A53T  $\alpha$ syn with LacZ (used as a control for viral charge). However, the expression of G2019S LRRK2 significantly increased the quantity of pS129  $\alpha$ syn-positive neurons compared to neurons expressing A53T  $\alpha$ syn in combination with LacZ or WT LRRK2. The co-expression of DK LRRK2 with A53T  $\alpha$ syn did not lead to this increase in pS129  $\alpha$ syn-positive neurons which implies that the modulation of pS129 was probably linked to LRRK2's kinase activity (Fig. 3B). This phosphorylation of  $\alpha$ syn was not associated with cell loss, as the counted number of NeuN-positive neurons was stable across conditions (data not shown) and an assessment of cell viability with resazurin did not reveal any toxicity in all these conditions (Fig. 3C).

#### Effect of A53T $\alpha$ syn and LRRK2 on mitochondrial bioenergetics.

To assess the impact of A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 on mitochondrial function, we evaluated different parameters reflecting the state of mitochondrial bioenergetics.

First, we measured the mitochondrial membrane potential in our model using the TMRE probe. We did not detect any variation between the different conditions of co-expression (Fig. 4A). We also evaluated the effect of the co-expression of WT and G2019S LRRK2 with A53T  $\alpha$ syn on cellular respiration using the Seahorse XFp but did not observe any differences either in basal respiration or in the presence of different mitochondrial toxins to challenge mitochondria (Fig. 4B). Next, we measured the total levels of intracellular ATP (Fig. 4C). We did not observe any difference in the total levels of ATP between cells expressing A53T  $\alpha$ syn + LacZ and cells expressing A53T  $\alpha$ syn + WT, G2019S or DK LRRK2.

We reasoned that, although total ATP levels remain rather stable in cells co-expressing A53T  $\alpha$ syn and LRRK2, there could be a difference in the "rate" and the "origin" of ATP synthesis. We therefore evaluated ATP

production rates by the respiratory chain (mitoATP) and by glycolysis (glycoATP) using the Real-Time ATP Rate Assay developed by Agilent (Seahorse). Overall, we observed significant differences in total ATP production rates. The differences observed between the different experimental conditions were the result of a difference in mitoATP production, since glycoATP production rate was the same across all conditions. Indeed, the cells co-expressing A53T  $\alpha$ syn and WT or G2019S LRRK2 had a significantly lower mitoATP production rate than cells co-expressing A53T  $\alpha$ syn + LacZ. Moreover, cells co-expressing A53T  $\alpha$ syn + DK LRRK2 had a significantly lower mitoATP production rate than every other condition (Fig. 4D). These results show that even if neurons were stressed, mitochondria managed to compensate and to maintain their homeostasis by adapting their ATP production rate.

#### Effet of A53T $\alpha$ syn and LRRK2 on mitochondrial dynamics

Because mitochondria are dynamic organelles undergoing fusion and fission events that are essential to their homeostasis, we evaluated by western blot the impact of A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 co-expression on mitochondria-related proteins. Mitofusin 2 (Mfn2) plays a role in mitochondrial fusion whereas Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) and Fis1 are involved in mitochondrial fission. Moreover, the phosphorylation of DRP1 at its S616 increases its activity to induce mitochondrial fission (Campello and Scorrano, 2010). We did not observe any difference in the expression of these mitochondrial proteins in all the different conditions, meaning that A53T  $\alpha$ syn, whether it is co-expressed with LRRK2 or not, does not impact mitochondrial fusion-fission proteins in our model (Fig. 5A).

To characterize mitochondrial movements, we imaged neurons expressing a fluorescent mitochondrial protein. In mature neurons (14 DIV), mitochondria were almost not moving (data not shown) as already reported in the literature (Lewis et al., 2016). Thus we performed the velocity experiments at 4-5 DIV, a stage at which LV already induced the expression of  $\alpha$ syn and LRRK2 (data not shown). Around 60% of mitochondria were mobile, with a mean speed of approximately 0.2 $\mu$ m/s (Fig. 5C, D). Mitochondrial anterograde and retrograde mean speeds were around 0.17 $\mu$ m/s in every condition (Fig. 5E, F). Mitochondria were spending approximately 45% of the time in anterograde and retrograde movement, and were in pause the remaining 10% of the time (Fig. 5G-I). For all the parameters cited above, no difference could be noted between all the conditions of transduction. However, we found that the mean distance travelled by mobile neuronal mitochondria (i.e. anterograde plus retrograde movements), showed a significant difference. In fact, neurons co-expressing A53T  $\alpha$ syn and WT or G2019S LRRK2 had mitochondria travelling more compared to A53T  $\alpha$ syn with LacZ (Fig. 5J).



## Discussion

To investigate the impact of A53T  $\alpha$ syn and LRRK2's co-expression on mitochondrial function in the context of PD, we used a lentiviral approach to co-express the two proteins in primary rat cortical neurons. This choice of cortical over midbrain cultures was motivated by the low proportion of dopaminergic neurons in the midbrain, ending up in only 10 to 20% of cultured midbrain neurons being positive for TH (Gaven et al., 2014). This low proportion of dopaminergic neurons in these cultures makes it difficult to really study molecular mechanisms related to the dopaminergic environment. Moreover, other brain regions and neuronal subtypes, other than DA neurons, are affected in PD. Notably, the cortex develops LB during the late stages of the disease according to the Braak hypothesis (Braak et al., 2003). Together with the fact that cortical cultures are more homogenous and more reproducible, these arguments led us to the decision to work in primary rat cortical neurons. These primary cortical neurons were infected with lentiviral vectors to express human A53T  $\alpha$ syn with LacZ as a control or with LRRK2. To be able to decipher between kinase activity-dependent and independent mechanisms, we worked with WT LRRK2, G2019S LRRK2 - which is supposed to have an increased kinase activity - and a double mutant G2019S/D1994A LRRK2 (DK), which is supposed to have a strongly decreased kinase activity.

First, by western blot, we checked that our constructs induced the expression of full length LRRK2 at its expected molecular weight of 286 kDa in HEK 293T cells and in neurons. Both WT and G2019S LRRK2 proteins were expressed at a similar level. However, DK LRRK2 had a lower expression level even though we used the same amount of plasmid/virus. We tried to increase it in HEK 293T cells but could not obtain a higher expression level (data not shown), which could mean that the D1994A mutation alters LRRK2's expression or processing/stability. It has also been reported *in vivo* that transgenic mice expressing a kinase dead variant of LRRK2 had reduced LRRK2 protein levels (Herzig et al., 2011), suggesting that kinase activity could be a regulator of LRRK2 protein homeostasis. This is corroborated by the fact that a prolonged pharmacological inhibition of LRRK2's kinase activity induces a decrease in LRRK2 protein levels (Fuji et al., 2015; Herzig et al., 2011; Lobbestael et al., 2016; Skibinski et al., 2014).

Next, we evaluated the kinase activity of the LRRK2 proteins both in HEK 293T cells and in the neuronal model co-expressing A53T  $\alpha$ syn and LRRK2. LRRK2 is known to be constitutively phosphorylated at its S935. In both models, we observed a weak decrease in the phosphorylation of this site when G2019S LRRK2 is expressed, and an important decrease with the DK mutant. This is in accordance with the literature, as it has been shown that the phosphorylation of this site is slightly decreased by LRRK2 pathogenic mutants such as G2019S (Li et al., 2011; Nichols et al., 2010) and very strongly by the treatment with pharmacological inhibitors of LRRK2's kinase activity and by DK mutants (Skibinski et al., 2014; Vancraenenbroeck et al., 2014). This implies that a kinase active LRRK2 protein would be highly phosphorylated at this site (like WT and G2019S LRRK2 are in our models), whereas a kinase inactive protein would be phosphorylated to a lesser extent (like DK LRRK2 is

in our models). The phosphorylation of S935 has been shown to be necessary for the interaction of LRRK2 with the 14-3-3 proteins, which control the subcellular localization of LRRK2 (Dzamko et al., 2010; Mamais et al., 2014; Nichols et al., 2010). Disruption of this interaction has been established to induce the accumulation of LRRK2 in cytoplasmic pools (Dzamko et al., 2010; Nichols et al., 2010) as well as to increase its ubiquitination and degradation in cell lines (Zhao et al., 2015). In our model, an increased degradation of DK LRRK2 linked to decreased pS935 could explain its lower expression level compared with WT and G2019S LRRK2, which are both highly phosphorylated at this site.

In HEK 293T cells, we also evaluated the phosphorylation of S1292. We observed a significant increase in G2019S LRRK2's autophosphorylation at this site and a very strong decrease with DK LRRK2, which is in accordance with what is described in the literature with LRRK2 mutants (Dzamko et al., 2010; Longo et al., 2017; Sheng et al., 2012). We could not detect pS1292 in primary neurons, but this was not surprising since it has been shown that the level of phosphorylation of this site is quite low (Lobbestael et al., 2013).

To conclude, we were able to obtain the expression of LRRK2 proteins that were phosphorylated at S935 and S1292 to a degree which was modulated as expected by the different LRRK2 mutations. These results are consistent with the production of enzymatically active WT and G2019S proteins, and a far less active DK LRRK2 protein.

We next used a lentiviral approach to efficiently co-express these different LRRK2 constructs and A53T  $\alpha$ syn in primary neurons. No impact of LRRK2 expression on the levels of  $\alpha$ syn could be noticed. As expected due to their previously described cellular localization,  $\alpha$ syn was mainly expressed in neurites (Iwai et al., 1995; Maroteaux et al., 1988) whereas LRRK2 had a rather somatic localization (Smith et al., 2005; West et al., 2014), limiting their effective co-localization inside the cells. We did not consider this as a limitation for the study of the impact of LRRK2 on  $\alpha$ syn-induced pathology since it is highly probable that this interaction goes through an indirect functional interaction between the two proteins (Reviewed in Cresto et al., 2019).

Because the phosphorylation of  $\alpha$ syn at its S129 is highly increased in PD, we used immunocytochemistry to evaluate this parameter in primary neurons co-expressing A53T  $\alpha$ syn and LRRK2. We observed a significant increase in the pathological phosphorylation of  $\alpha$ syn at its S129 in the presence of G2019S LRRK2 but not with the WT or DK LRRK2, which suggests that the increased kinase activity of G2019S LRRK2 could increase  $\alpha$ syn's phosphorylation and probably its pathogenicity. In animals expressing G2019S LRRK2, there was a significant increase in pS129-positive inclusions in the SNpc, 1 month after the injection of  $\alpha$ syn fibrils (Volpicelli-daley et al., 2016). This result was also reproduced in primary neurons from G2019S LRRK2 transgenic mice, indicating that G2019S LRRK2 could increase  $\alpha$ syn-induced pathology (Bieri et al., 2019; Volpicelli-daley et al., 2016). Moreover, another study confirmed these observations in primary hippocampal neurons from G2019S LRRK2 transgenic mice compared to non-transgenic neurons, but conversely did not

replicate this effect in primary midbrain cultures, which implies that the cellular environment has a strong impact on  $\alpha$ syn pathology (Henderson et al., 2018). In our model, after 13 days of expression,  $\alpha$ syn stained with the pS129  $\alpha$ syn antibody had a rather somatic expression compared to human A53T  $\alpha$ syn, which had a higher expression level in the neurites than in the soma. It has been suggested that this post-translational modification could play a role in  $\alpha$ syn's addressing to the degradation machinery (Machiya et al., 2010). Additionally, it has been shown in neurons that during the degradation process by autophagy, cargoes are retrogradely transported by autophagosomes along axons to reach the soma where they fuse with lysosomes to be degraded (Maday and Holzbaur, 2016). Therefore, the phosphorylation of  $\alpha$ syn (pS129) could be a targeting signal for its degradation, which results from a somatic re-localization in neurons. The fact that we see an accumulation of pS129  $\alpha$ syn in the neuronal soma could either mean that the degradation process is not completed yet or that it is dysfunctional. Indeed, it is known that both A53T  $\alpha$ syn and G2019S LRRK2 can impair autophagy (Cuervo et al., 2004; Orenstein et al., 2013).

We did not observe  $\alpha$ syn or pS129  $\alpha$ syn aggregates *per se*. Different hypothesis could explain this observation: (i) a longer incubation could be necessary to observe aggregation, (ii) maybe there is an element missing in cortical neurons compared to DA neurons that is necessary for  $\alpha$ syn-induced aggregation, (iii) *in vitro* cultures could lack the complex cerebral environment that would influence  $\alpha$ syn's aggregation, (iv) rodent physiologically expresses the A53T  $\alpha$ syn variant without developing LB pathology over-time. As a result, rodents might be less sensitive to A53T  $\alpha$ syn's toxicity, and endogenous  $\alpha$ syn less prone to aggregation. Expressing human A53T  $\alpha$ syn in a rodent background could therefore mitigate mutant  $\alpha$ syn's toxicity by reducing its seeding ability. This hypothesis has already been addressed in transgenic A53T  $\alpha$ syn mice in a KO  $\alpha$ syn genetic background (Cabin et al., 2005).

Despite the lack of aggregates, the phosphorylation of  $\alpha$ syn at S129 (a pathologic site), its somatic localization, and its modulation by LRRK2's kinase activity suggest a pathologic mechanism activated in our model even though it might probably not be strong enough to induce  $\alpha$ syn aggregation and cell death.

As we explained in introduction, both LRRK2 and  $\alpha$ syn have been shown to induce mitochondrial defects in various models (reviewed in Cresto et al., 2019). To evaluate if this increase in the pathological phosphorylation of  $\alpha$ syn was associated with mitochondrial toxicity, we measured mitochondrial membrane potential, respiration and ATP levels, but did not see any impact of A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 on these parameters. Some teams have previously shown that the overexpression of  $\alpha$ syn in primary neurons could lead to a significant decrease in ATP levels and cell viability, which we did not reproduce. These discrepancies could result from technical issues: (i) transfection vs transduction, (ii) duration of transgene expression and (iii) differences in neuronal maturity (Choubey et al., 2011; Liu et al., 2017). However another paper, in a model similar to ours, using lentiviruses to overexpress A53T  $\alpha$ syn in rat primary cortical neurons, did not report any toxicity 6 days post transduction, which is more in agreement with our data (Butler et al., 2012).

Moreover, maintaining stable levels of ATP and mitochondrial membrane potential is thought to be a prerequisite for normal cell functioning. This suggests that a prolonged perturbation could lead to cell loss (Zorova et al., 2018). It is therefore possible that cells would maintain these parameters stable at all cost, and we did not observe any mortality, meaning that they succeeded. Our findings that indicate significant differences in mitochondrial ATP production rates in the presence of  $\alpha$ syn and LRRK2 are consistent with this hypothesis. More precisely, when we distinguished between mitochondrial and glycolytic ATP production rates, results revealed that it was mitoATP production rate that was significantly altered. This might result from a higher energetic demand of A53T  $\alpha$ syn-expressing cells or a lower ATP consumption by A53T  $\alpha$ syn + LRRK2 - expressing cells. It is tempting to speculate that in our experimental conditions, this does not have major deleterious consequences. In the long term however, it is conceivable that change in ATP production rates may lead to a difference in mitochondrial ROS production, which in turn could have detrimental effects.

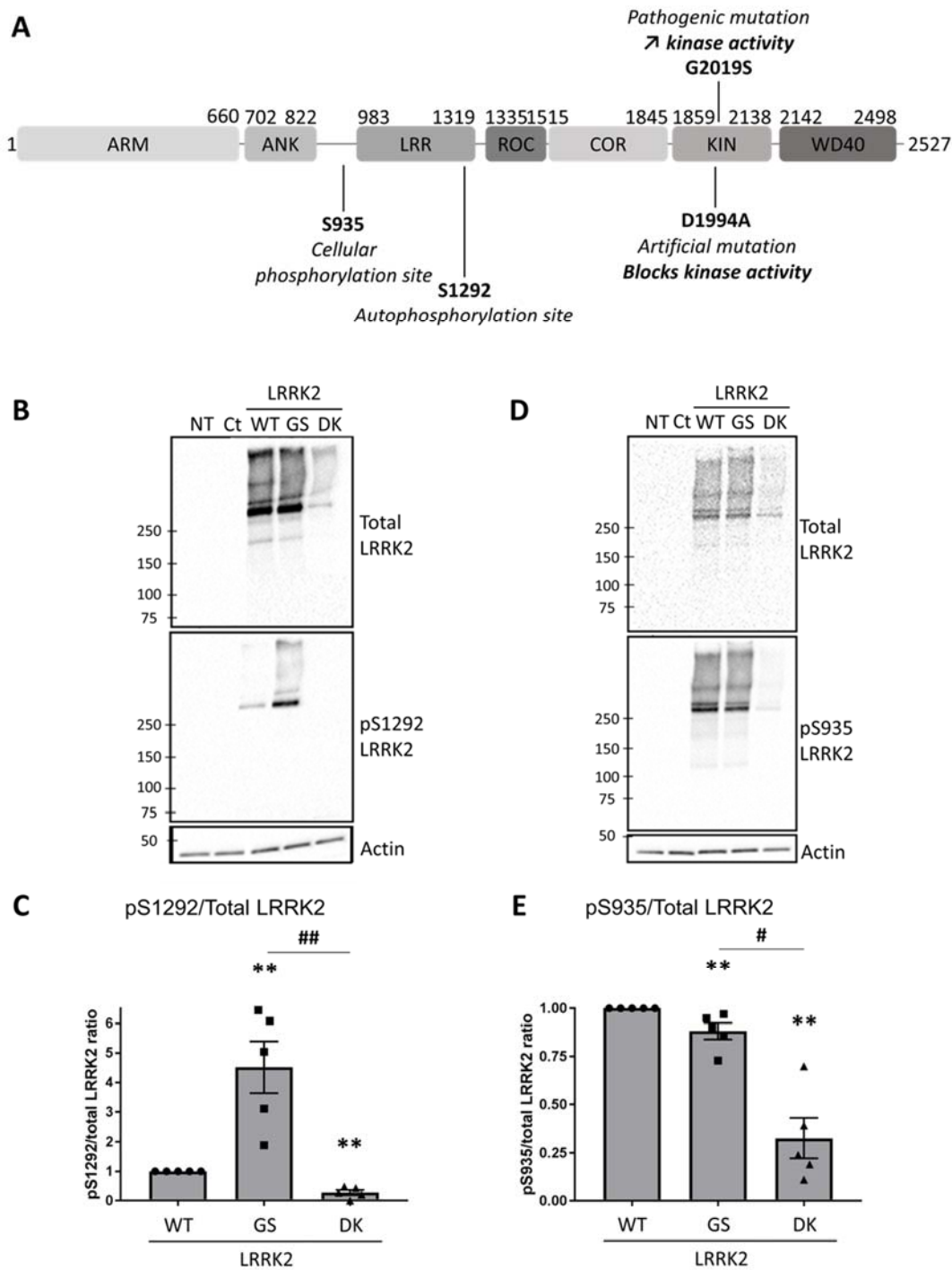
Another important part of mitochondrial homeostasis that has been shown to be impacted by both  $\alpha$ syn and LRRK2 is mitochondrial dynamics. Mitochondria form a dynamic network that is undergoing constant fusion and fission events. We therefore measured by western blot the expression of some of the proteins involved in these events (DRP1, Mfn2, Fis1) but could not detect any differences between conditions. However, looking more closely at mitochondrial dynamics, we observed that mitochondria from neurons co-expressing A53T  $\alpha$ syn + WT/G2019S LRRK2 travelled longer distances than mitochondria from neurons expressing A53T  $\alpha$ syn + LacZ.

In primary cortical neurons from A53T transgenic mice electroporated to express DsRed-mito, Li and collaborators showed that mitochondrial velocity was very strongly decreased at 7 DIV and 14 DIV compared to WT neurons (Li et al., 2013). We tried these analyzes at the same time points in our transduced model but mitochondria were barely moving (data not shown). Maybe this difference is due to the fact that we transduce neurons with lentiviruses, or the fact that we use BrainPhys™ medium instead of Neurobasal alone. Indeed, BrainPhys has been shown to ameliorate synaptic activity in cultured neurons (Bardy et al., 2015) and it has been shown that mitochondria motility was dramatically reduced in mature cortical neurons and that this event coincided with increased localization to presynaptic sites (Lewis et al., 2016). Therefore, by using a medium that increases the functionality of synapses we could also increase mitochondrial sequestration at presynaptic sites, therefore strongly decreasing their motility in mature neurons. Lewis and collaborators showed that in primary mouse cortical neurons around 40% of mitochondria were stationary at 3 DIV, and around 50% at 7 DIV (Lewis et al., 2016). Based on these observations and ours, we studied mitochondrial motility at 4-5 DIV.  $\alpha$ syn and LRRK2 were already expressed at this stage (data not shown). Among the moving mitochondria, the average speed was of 0.2 $\mu$ m/s. In opposition to the study by Li and collaborators (Li et al., 2013), we could not detect any impact of A53T  $\alpha$ syn on mitochondrial velocity, and we did not see any difference in anterograde or retrograde movement in cells expressing A53T  $\alpha$ syn alone with or without WT or

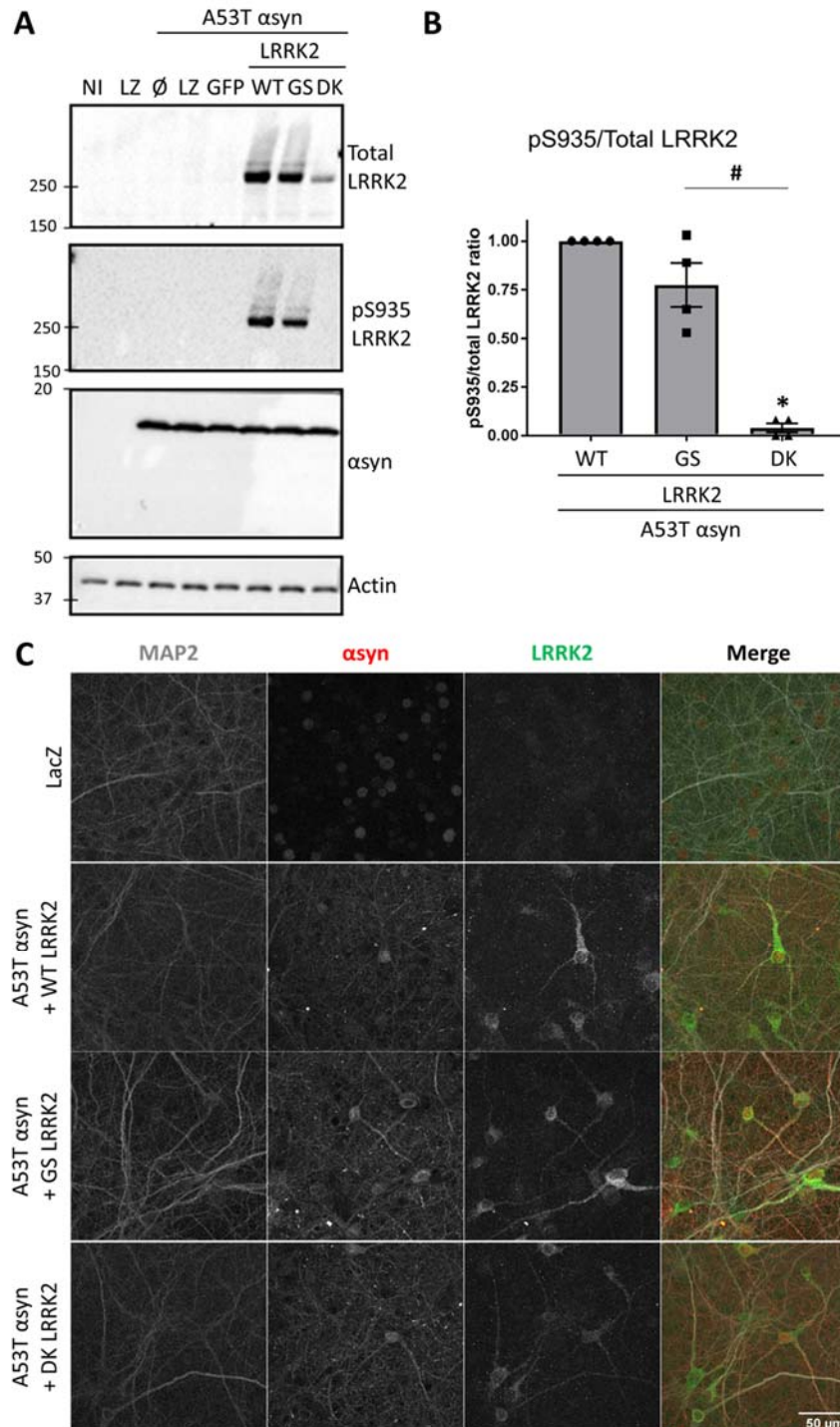
G2019S LRRK2. However, we did find that cells expressing A53T  $\alpha$ syn and WT or G2019S LRRK2 had a significant increase in the distance travelled by each mitochondria compared to cells expressing A53T  $\alpha$ syn and LacZ as a control. It has been shown that G2019S LRRK2 delayed mitochondrial arrest subsequently to the stabilization of Miro, an outer mitochondrial membrane protein that anchors the molecular motors to mitochondria in dopaminergic neurons derived from iPS cells (Hsieh et al., 2016). In accordance with this study, we observed that mitochondria travelled further when LRRK2 was co-expressed with A53T  $\alpha$ syn, suggesting a prolonged anchoring of mitochondria to molecular motors and microtubules but without changing the mean mitochondrial speed.

To summarize, we showed that LRRK2 G2019S leads to an increased number of pS129  $\alpha$ syn-positive neurons in a kinase-dependent manner. Even though there was no  $\alpha$ syn aggregation or cell loss, this indicates the activation of a pathological mechanism specific to G2019S LRRK2. We investigated if this pathological alteration was associated with mitochondrial dysfunction. Although mitochondria were globally able to maintain their homeostasis, differences in mitochondrial ATP production rate and mean distance travelled by mitochondria were observed when enzymatically active LRRK2 was co-expressed with A53T  $\alpha$ syn. This could be indicative of a moderate mitochondrial stress, consistent with the absence of cell death. It would be interesting to see if LRRK2 inhibitors could reverse this phenotype, which would prove their efficacy in our model of early degeneration/dysfunction linked to both proteins known to play a central role in PD pathogenesis.

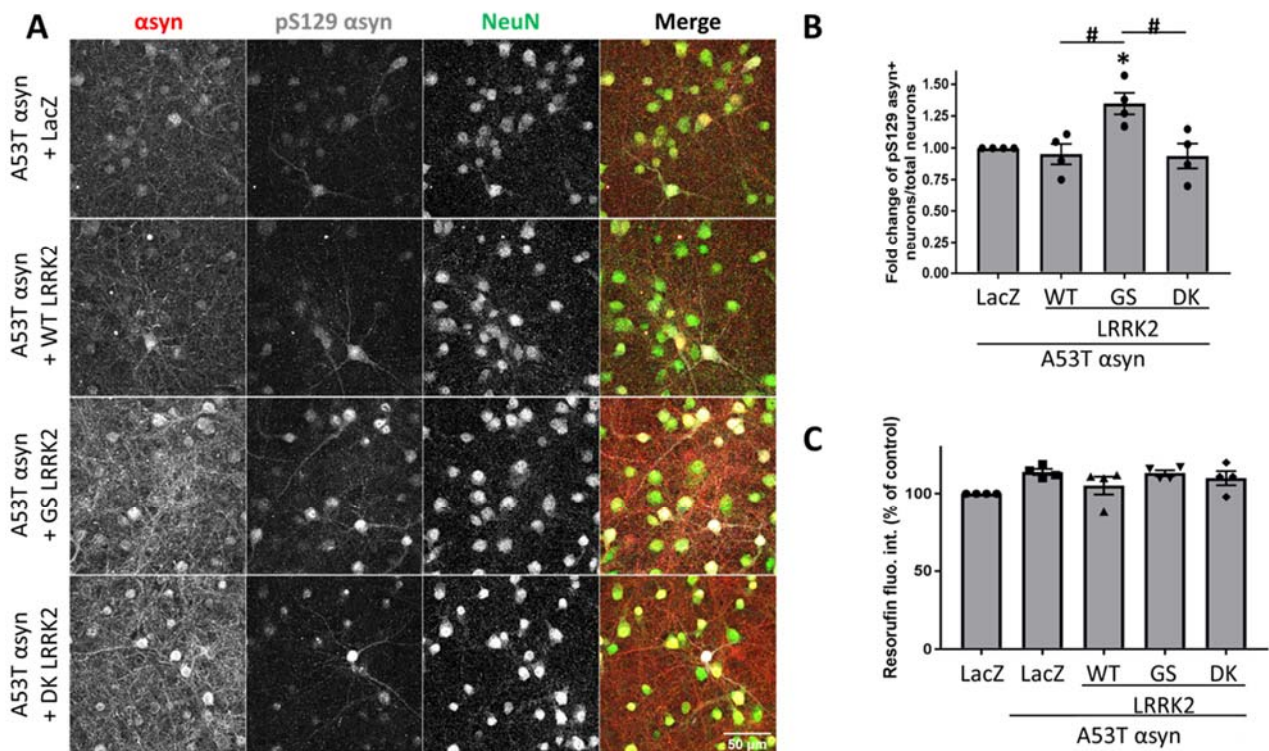
Figures



**Figure 1. LRRK2 is functional and enzymatically active in HEK 293T cells.** (A) Schematic view of LRRK2 depicting its different domains and the phosphorylation sites we used to assess kinase activity. Adapted from De Wit et al., 2018. (B-E) HEK293T cells were transfected with a plasmid coding for pcDNA (Ct) as a control or WT, G2019S (GS) or DK LRRK2 and total proteins were extracted 48h later. NT = non transfected. Representative immunoblots showing (B) LRRK2's autophosphorylation at S1292 (pS1292) or (D) LRRK2's phosphorylation at S935, total LRRK2 and the loading control actin. Quantification of (C) pS1292 or (E) pS935 LRRK2 over total LRRK2. The phosphorylation level of LRRK2 in cells expressing WT LRRK2 was set as the baseline level of the experiment. N=5. Mean  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$  compared to LRRK2 WT, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  compared to G2019S LRRK2, Mann-Whitney test.

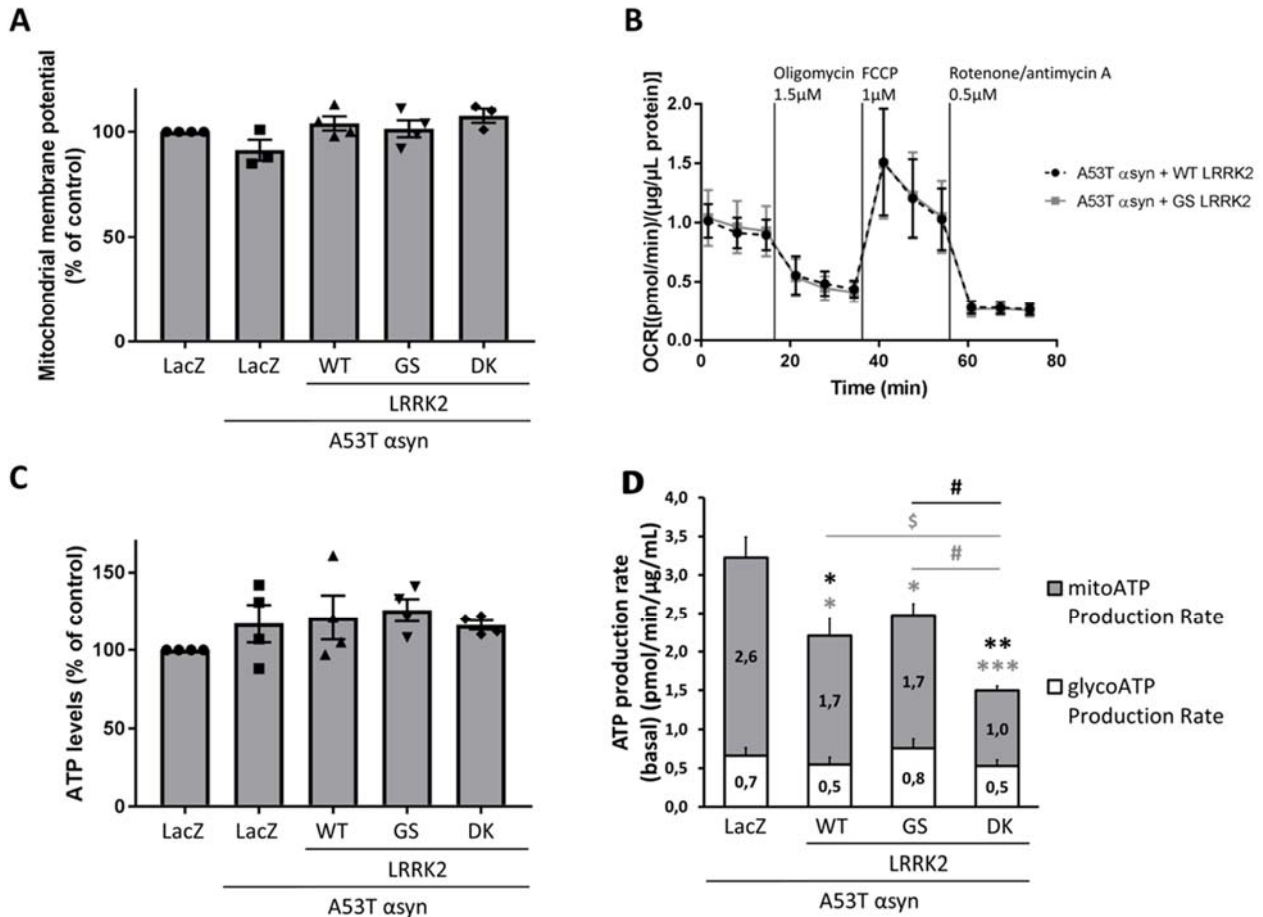


**Figure 2. Lentiviral transduction induces the expression of A53T αsyn and an enzymatically active LRRK2 in primary neurons.** Primary rat cortical neurons were co-infected at DIV1 with lentiviruses coding for A53T αsyn and WT, G2019S (GS) or DK LRRK2, and GFP or LacZ (LZ) as a control. (A) At DIV14, total proteins were extracted and western blots were performed to verify the levels of expression of αsyn and LRRK2 and the phosphorylation of LRRK2 at its S935, with actin as a loading control. (B) Quantification of pS935 LRRK2 over total LRRK2. The phosphorylation level of LRRK2 in cells expressing A53T αsyn + WT LRRK2 was set as the baseline level for the experiment. N = 4. (C) At DIV14, cells were fixed and immunolabelled with MAP2, αsyn and LRRK2 antibodies to check their cellular localization. Representative immunofluorescence confocal images, N=3. Scale bar = 50µm. Mean ± SEM. \* p<0.05 compared to A53T αsyn + WT LRRK2, # p<0.05 compared to A53T αsyn + G2019S LRRK2, Mann-Whitney test.

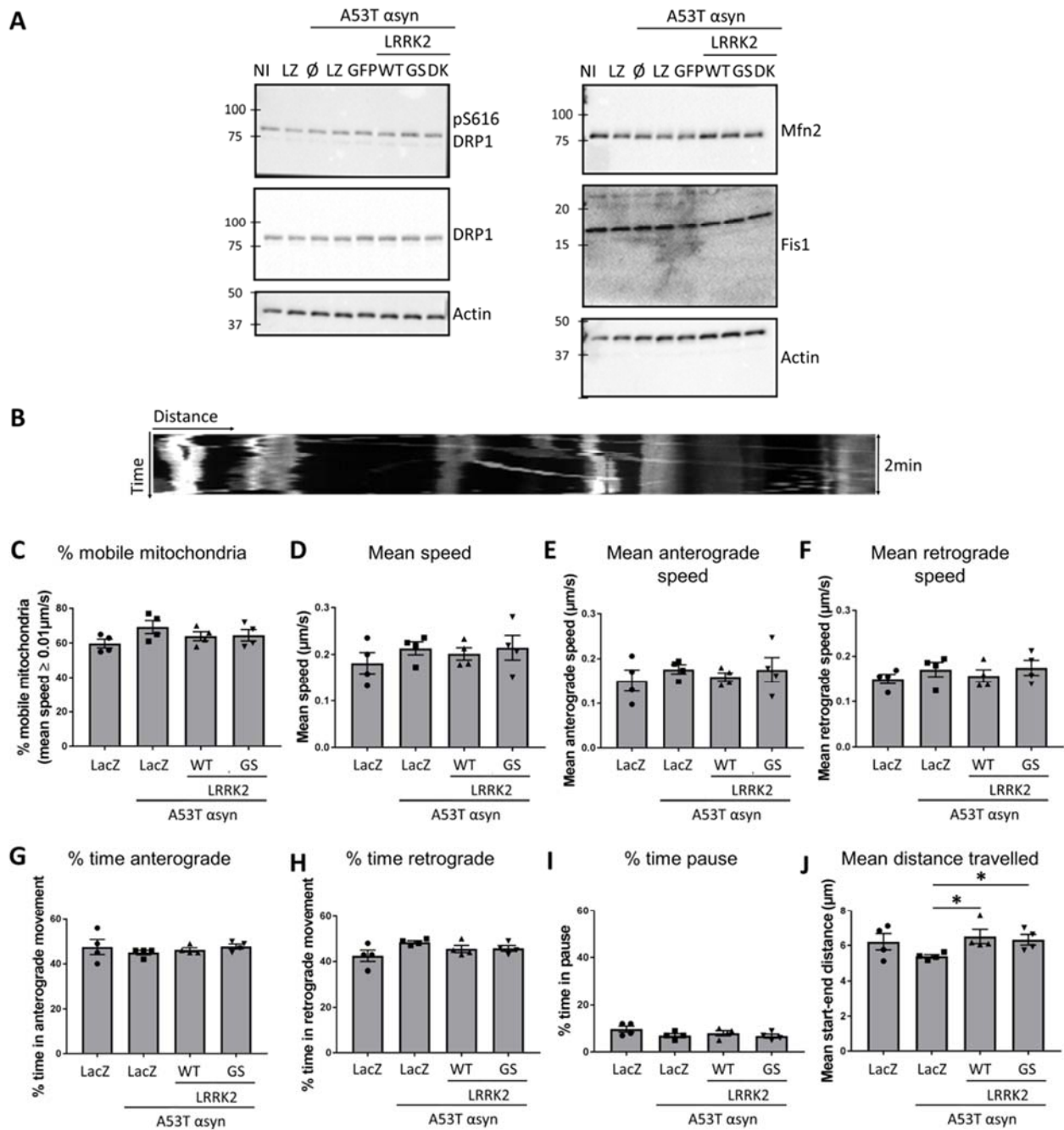


**Figure 41. Mutant G2019S LRRK2 induces a significant increase in pS129  $\alpha$ syn-positive neurons without causing any cell loss.** Primary rat cortical neurons were co-infected at DIV1 with lentiviruses coding for A53T  $\alpha$ syn and WT, G2019S (GS) or DK LRRK2, and LacZ as a control. At DIV14, cells were fixed and immunolabelled with pS129  $\alpha$ syn and NeuN antibodies. (A) Representative confocal images showing the expression of  $\alpha$ syn and pS129  $\alpha$ syn in neurons (identified by a NeuN staining). Scale bar = 50 $\mu$ m (B) Fold change of the number pS129  $\alpha$ syn+ cells over the number of NeuN+ cells. The pS129  $\alpha$ syn neurons/total neurons ratio in cells expressing A53T  $\alpha$ syn + LacZ was set as the baseline level for the experiment. 11 fields counted per condition (approximately 500 neurons), N=4. (C) At DIV14, cell viability was assessed by measuring the transformation of resazurin into fluorescent resorufin. n=12-15, N=4-8. Mean  $\pm$  SEM. \* p<0.05 compared to A53T  $\alpha$ syn + LacZ, # p<0.05 compared to A53T  $\alpha$ syn + G2019S LRRK2, Mann-Whitney test.





**Figure 4. Effect of A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 on mitochondrial bioenergetics.** Primary rat cortical neurons were co-infected at DIV1 with lentiviruses coding for A53T  $\alpha$ syn and WT, G2019S (GS) or DK LRRK2, and LacZ as a control. (A) At DIV14, we evaluated mitochondrial membrane potential using the TMRE probe (n=12-15, N=3-4). (B) Mitochondrial energy metabolism was measured using a Seahorse Bioscience XFp analyser (Agilent). During testing, cells were treated with 1.5 $\mu$ M oligomycin, 1 $\mu$ M FCCP and 0.5 $\mu$ M rotenone/antimycin A. OCR data were normalized by the quantity of protein ( $\mu$ g/mL) present in each well. n=3, N=4. (C) Total ATP levels were assessed using the CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 assay (n=12, N=4). (D) Mitochondrial and glycolysis ATP production rates were measured using the Real-Time ATP Rate Assay and the Seahorse XFp analyser (Agilent) (n=3-6, N=3-4). Mean  $\pm$  SEM. \* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0,001 compared to A53T  $\alpha$ syn + LacZ. \$ p<0,05 compared to A53T  $\alpha$ syn + WTLRRK2. # p<0.05 compared to A53T  $\alpha$ syn + G2019S LRRK2. Symbols in black represent the statistical analysis of total ATP production rate while grey symbols represent the statistical analysis of mitoATP production rate. There was no significant variation of glycoATP production rate. One-way ANOVA followed by Fisher post-hoc.



**Figure 42. Effect of A53T  $\alpha$ syn and LRRK2 on mitochondrial dynamics.** Primary rat cortical neurons were co-infected at DIV1 with lentiviruses coding for A53T  $\alpha$ syn and WT, G2019S (GS) or DK LRRK2, and LacZ (=LZ) as a control. (A) Representative western blot analysis of different mitochondria-related proteins extracted at DIV14. N=3. (B-J) At DIV4-5, individual DsRed2-mito electroporated neurons were imaged in time-lapse fluorescent microscopy to follow mitochondrial movements. (B) Representative kymograph generated from the 2min movie of a LacZ-expressing neuron. (C) Percentage of mobile mitochondria. (D) Mean speed, (E) mean anterograde and (F) retrograde speed, (G) anterograde, (H) retrograde and (I) stationary mitochondria percentage and (J) mean distance travelled by each mobile mitochondria. n=10 neurons/condition, N=4. Mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test.

## **Acknowledgements**

This work was funded by rolling grants from the CEA and the CNRS.

The research generating these results received funding from France Parkinson. Camille Gardier is a recipient of a PhD fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research (2016).

We thank Pascale Bertrand and Gaëlle Pennarun for letting us use their Amaxa. We also thank Nathalie Gault for letting us use the Seahorse XFp Analyzer.

## **Conflict of Interest Statement**

All authors declare that they have no conflict of interest

## **References**

Anand, V.S., Reichling, L.J., Lipinski, K., Stochaj, W., Duan, W., Kelleher, K., Pungaliya, P., Brown, E.L., Reinhart, P.H., Somberg, R., et al. (2009). Investigation of leucine-rich repeat kinase 2 : enzymological properties and novel assays. *FEBS J.* 276, 466–478.

Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., et al. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of  $\alpha$ -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J. Biol. Chem.* 281, 29739–29752.

Bardy, C., van den Hurk, M., Eames, T., Marchand, C., Hernandez, R.V., Kellogg, M., Gorris, M., Galet, B., Palomares, V., Brown, J., et al. (2015). Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E2725–E2734.

Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.-C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.-M., Hirsch, E., Hantraye, P., et al. (2006). Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol. Biol. Cell* 17, 1652–1663.

Benchoua, A., Trioulier, Y., Diguët, E., Malgorn, C., Gaillard, M.-C., Dufour, N., Elalouf, J.-M., Krajewski, S., Hantraye, P., Déglon, N., et al. (2008). Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1446–1456.

Bendor, J.T., Logan, T.P., and Edwards, R.H. (2013). The Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Neuron* 79, 1044–1066.

Bieri, G., Brahic, M., Bousset, L., Couthouis, J., Kramer, N.J., Ma, R., Nakayama, L., Monbureau, M., Defensor, E., Schüle, B., et al. (2019). LRRK2 modifies  $\alpha$ -syn pathology and spread in mouse models and human neurons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 137, 961–980.

Biskup, S., Moore, D.J., Celsi, F., Higashi, S., West, A.B., Andrabi, S.A., Kurkinen, K., Yu, S.W., Savitt, J.M., Waldvogel, H.J., et al. (2006). Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann. Neurol.* 60, 557–569.

Braak, H., Tredici, K.D., Rüb, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.

Butler, E.K., Voigt, A., Lutz, A.K., Toegel, J.P., Gerhardt, E., Karsten, P., Falkenburger, B., Reinartz, A., Winklhofer, K.F., and Schulz, J.B. (2012). The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-synuclein toxicity. *PLoS Genet.* 8.

Cabin, D.E., Gispert-Sanchez, S., Murphy, D., Auburger, G., Myers, R.R., and Nussbaum, R.L. (2005). Exacerbated synucleinopathy in mice expressing A53T SNCA on a Snca null background. *Neurobiol. Aging* 26, 25–35.

Campello, S., and Scorrano, L. (2010). Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 11, 678–684.

Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., et al. (2004). alpha-Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167–1169.

Chinta, S.J., Mallajosyula, J.K., Rane, A., and Andersen, J.K. (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci. Lett.* 486, 235–239.

Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, 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.

Cresto, N., Gardier, C., Gubinelli, F., Gaillard, M.-C., Liot, G., West, A.B., and Brouillet, E. (2019). The Unlikely Partnership Between LRRK2 and alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurosci.* 0–1.

Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–1295.

Daher, J.P.L., Pletnikova, O., Biskup, S., Musso, A., Gellhaar, S., Galter, D., Troncoso, J.C., Lee, M.K., Dawson, T.M., Dawson, V.L., et al. (2012). Neurodegenerative phenotypes in an A53T alpha-synuclein transgenic mouse model are independent of LRRK2. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2420–2431.

Daher, J.P.L., Abdelmotilib, H.A., Hu, X., Volpicelli-Daley, L.A., Moehle, M.S., Fraser, K.B., Needle, E., Chen, Y., Steyn, S.J., Galatsis, P., et al. (2015). Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates alpha-Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 290, 19433–19444.

Di Maio, R., Barrett, P.J., Hoffman, E.K., Barrett, C.W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C.T., Burton, E.A., et al. (2016). alpha-synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 8.

Di Maio, R., Hoffman, E.K., Rocha, E.M., Keeney, M.T., Sanders, L.H., De Miranda, B.R., Zharikov, A., Van Laar, A., Stepan, A.F., Lanz, T.A., et al. (2018). LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 10, eaar5429.

Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., et al. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384–386.

Dusonchet, J., Kochubey, O., Stafa, K., Young, S.M., Zufferey, R., Moore, D.J., Schneider, B.L., and Aebischer, P. (2011). A Rat Model of Progressive Nigral Neurodegeneration Induced by the Parkinson's Disease-Associated G2019S Mutation in LRRK2. *J. Neurosci.* 31, 907–912.

Dzamko, N., Deak, M., Hentati, F., Reith, A.D., Prescott, A.R., Alessi, D.R., and Nichols, R.J. (2010). Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser 910 /Ser 935 , disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochem. J.* 430, 405–413.

Fan, Y., Howden, A.J.M., Sarhan, A.R., Lis, P., Ito, G., Martinez, T.N., Brockmann, K., Gasser, T., Alessi, D.R., and Sammler, E.M. (2018). Interrogating Parkinson's disease LRRK2 kinase pathway activity by assessing Rab10 phosphorylation in human neutrophils. *Biochem. J.* 475, 23–44.

Fuji, R.N., Flagella, M., Baca, M., Baptista, M.A.S., Brodbeck, J., Chan, B.K., Fiske, B.K., Honigberg, L., Jubb, A.M., Katavolos, P., et al. (2015). Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung. *Sci. Transl. Med.* 7, 273ra15-273ra15.

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160–164.

Gaven, F., Marin, P., and Claeysen, S. (2014). Primary Culture of Mouse Dopaminergic Neurons. *J. Vis. Exp. JoVE.*

Gilks, W.P., Abou-Sleiman, P.M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A.J., Shaw, K., Bhatia, K.P., Bonifati, V., Quinn, N.P., et al. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365, 415–416.

Greggio, E., Jain, S., Kingsbury, A., Bandopadhyay, R., Lewis, P., Kaganovich, A., van der Brug, M.P., Beilina, A., Blackinton, J., Thomas, K.J., et al. (2006). Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol. Dis.* 23, 329–341.

Henderson, M.X., Peng, C., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2018). LRRK2 activity does not dramatically alter  $\alpha$ -synuclein pathology in primary neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 45.

Herzig, M.C., Kolly, C., Persohn, E., Theil, D., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmelen, C., Troxler, T.J., Schmid, P., Danner, S., et al. (2011). LRRK2 protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4209–4223.

Herzig, M.C., Bidinosti, M., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmelen, C., Weiss, A., Danner, S., Vidotto, N., Stauffer, D., Barske, C., et al. (2012). High LRRK2 levels fail to induce or exacerbate neuronal alpha-synucleinopathy in mouse brain. *PLoS One* 7.

Hottinger, A.F., Azzouz, M., Déglon, N., Aebischer, P., and Zurn, A.D. (2000). Complete and Long-Term Rescue of Lesioned Adult Motoneurons by Lentiviral-Mediated Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Facial Nucleus. *J. Neurosci.* 20, 5587–5593.

Hsieh, C.-H., Shaltouki, A., Gonzalez, A.E., Bettencourt da Cruz, A., Burbulla, L.F., St Lawrence, E., Schüle, B., Krainc, D., Palmer, T.D., and Wang, X. (2016). Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* 19, 804–828.

Ibáñez, P., Bonnet, A.-M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Agid, Y., Dürr, A., Brice, A., and Pollak, P. (2004). Causal relation between  $\alpha$ -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet* 364, 1169–1171.

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.

Langston, J.W., and Ballard, P.A. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* 309, 310.

Langston, J.W., Forno, L.S., Rebert, C.S., and Irwin, I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292, 390–394.

Lee, B.D., Shin, J.-H., VanKampen, J., Petrucelli, L., West, A.B., Ko, H.S., Lee, Y., Maguire-Zeiss, K.A., Bowers, W.J., Federoff, H.J., et al. (2010). Inhibitors of Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Protect Against LRRK2-Models of Parkinson's Disease. *Nat. Med.* 16, 998–1000.

Lee, J.H., Han, J.-H., Kim, H., Park, S.M., Joe, E.-H., and Jou, I. (2019). Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutant acts through regulation of SERCA activity to control ER stress in astrocytes. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 68.

Lewis, T.L., Turi, G.F., Kwon, S.-K., Losonczy, A., and Polleux, F. (2016). Progressive Decrease of Mitochondrial Motility during Maturation of Cortical Axons In Vitro and In Vivo. *Curr. Biol.* 26, 2602–2608.

Li, L., Nadanaciva, S., Berger, Z., Shen, W., Paumier, K., Schwartz, J., Mou, K., Loos, P., Milici, A.J., Dunlop, J., et al. (2013). Human A53T  $\alpha$ -synuclein causes reversible deficits in mitochondrial function and dynamics in primary mouse cortical neurons. *PLoS ONE* 8.

Li, W.-W., Yang, R., Guo, J.-C., Ren, H.-M., Zha, X.-L., Cheng, J.-S., and Cai, D.-F. (2007). Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport* 18, 1543–1546.

Li, X., Wang, Q.J., Pan, N., Lee, S., Zhao, Y., Chait, B.T., and Yue, Z. (2011). Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Binding to LRRK2 Is Impaired by Common Mutations of Familial Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 6.

Lin, X., Parisiadou, L., Gu, X.L., Wang, L., Shim, H., Sun, L., Xie, C., Long, C.X., Yang, W.J., Ding, J., et al. (2009). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates the Progression of Neuropathology Induced by Parkinson's-Disease-Related Mutant  $\alpha$ -synuclein. *Neuron* 64, 807–827.

Liu, J., Wang, X., Lu, Y., Duan, C., Gao, G., Lu, L., and Yang, H. (2017). Pink1 interacts with  $\alpha$ -synuclein and abrogates  $\alpha$ -synuclein-induced neurotoxicity by activating autophagy. *Cell Death Dis.* 8, e3056.

Lobbestael, E., Zhao, J., Rudenko, I.N., Beylina, A., Gao, F., Wetter, J., Beullens, M., Bollen, M., Cookson, M.R., Baekelandt, V., et al. (2013). Identification of protein phosphatase 1 as a regulator of the LRRK2 phosphorylation cycle. *Biochem. J.* 456, 119–128.

Lobbestael, E., Civiero, L., Wit, T.D., Taymans, J.-M., Greggio, E., and Baekelandt, V. (2016). Pharmacological LRRK2 kinase inhibition induces LRRK2 protein destabilization and proteasomal degradation. *Sci. Rep.* 6, 33897.

Longo, F., Mercatelli, D., Novello, S., Arcuri, L., Brugnoli, A., Vincenzi, F., Russo, I., Berti, G., Mabrouk, O.S., Kennedy, R.T., et al. (2017). Age-dependent dopamine transporter dysfunction and Serine129 phospho- $\alpha$ -synuclein overload in G2019S LRRK2 mice. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 22.

Machiya, Y., Hara, S., Arawaka, S., Fukushima, S., Sato, H., Sakamoto, M., Koyama, S., and Kato, T. (2010). Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein at Ser-129 Is Targeted to the Proteasome Pathway in a Ubiquitin-independent Manner. *J. Biol. Chem.* 285, 40732–40744.

MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K., and Abeliovich, A. (2006). The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology. *Neuron* 52, 587–593.

Maday, S., and Holzbaur, E.L.F. (2016). Compartment-Specific Regulation of Autophagy in Primary Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 5933–5945.

Mamais, A., Chia, R., Beilina, A., Hauser, D.N., Hall, C., Lewis, P.A., Cookson, M.R., and Bandopadhyay, R. (2014). Arsenite stress down-regulates phosphorylation and 14-3-3 binding of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), promoting self-association and cellular redistribution. *J. Biol. Chem.* 289, 21386–21400.

Maroteaux, L., Campanelli, J.T., and Scheller, R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8, 2804–2815.

Martin, L.J., Pan, Y., Price, A.C., Sterling, W., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., and Lee, M.K. (2006). Parkinson's Disease  $\alpha$ -synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.* 26, 41–50.

Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T., and Kagawa, Y. (1989). Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1450–1455.

Nakamura, K., Nemani, V.M., Wallender, E.K., Kaehlcke, K., Ott, M., and Edwards, R.H. (2008). Optical reporters for the conformation of alpha-synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 12305–12317.

Nichols, R.J., Dzamko, N., Morrice, N.A., Campbell, D.G., Deak, M., Ordureau, A., Macartney, T., Tong, Y., Shen, J., Prescott, A.R., et al. (2010). 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochem. J.* 430, 393–404.

Novello, S., Arcuri, L., Dovero, S., Dutheil, N., Shimshek, D.R., Bezard, E., and Morari, M. (2018). G2019S LRRK2 mutation facilitates  $\alpha$ -synuclein neuropathology in aged mice. *Neurobiol. Dis.* 120, 21–33.

Orenstein, S.J., Kuo, S.-H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., Cortes, E., Honig, L.S., Dauer, W., Consiglio, A., et al. (2013). Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* 16, 394–406.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.E., and Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 1–21.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.

Roosen, D.A., and Cookson, M.R. (2016). LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. *Mol. Neurodegener.* 11, 73.

Schapira, a H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823–827.

Shahmoradian, S.H., Lewis, A.J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T.E., Navarro, P.P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K.N., et al. (2019). Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* 22, 1099–1109.

Sheng, Z., Zhang, S., Bustos, D., Kleinheinz, T., Le Pichon, C.E., Dominguez, S.L., Solanoy, H.O., Drummond, J., Zhang, X., Ding, X., et al. (2012). Ser1292 Autophosphorylation Is an Indicator of LRRK2 Kinase Activity and Contributes to the Cellular Effects of PD Mutations. *Sci. Transl. Med.* 4, 164ra161-164ra161.

Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.

Skibinski, G., Nakamura, K., Cookson, M.R., and Finkbeiner, S. (2014). Mutant LRRK2 toxicity in neurons depends on LRRK2 levels and synuclein but not kinase activity or inclusion bodies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 418–433.

Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Moore, D.J., Liang, Y., West, A.B., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (2005). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18676–18681.

Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (2006). Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat. Neurosci.* 9, 1231–1233.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997).  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.

Steger, M., Tonelli, F., Ito, G., Davies, P., Trost, M., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, E., Duddy, G., Wilson, S., et al. (2016). Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *ELife* 5, 1–28.

Subramaniam, S.R., Vergnes, L., Franich, N.R., Reue, K., and Chesselet, M.F. (2014). Region specific mitochondrial impairment in mice with widespread overexpression of alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* 70, 204–213.

Vanraenenbroeck, R., De Raeymaecker, J., Lobbstaël, E., Gao, F., De Maeyer, M., Voet, A., Baekelandt, V., and Taymans, J.-M. (2014). In silico, in vitro and cellular analysis with a kinome-wide inhibitor panel correlates cellular LRRK2 dephosphorylation to inhibitor activity on LRRK2. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 51.

Volpicelli-daley, X.L.A., Abdelmotilib, X.H., Liu, Z., Stoyka, L., Daher, L., Milnerwood, X.A.J., Unni, V.K., Hirst, W.D., Yue, Z., Zhao, H.T., et al. (2016). G2019S-LRRK2 Expression Augments Alpha-Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons. *Neurobiol. Dis.* 36, 7415–7427.

West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16842–16847.

West, A.B., Moore, D.J., Choi, C., Andrabi, S.A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.L., Dawson, V.L., et al. (2007). Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 16, 223–232.

West, A.B., Cowell, R.M., Daher, J.P.L., Moehle, M.S., Hinkle, K.M., Melrose, H.L., Standaert, D.G., and Volpicelli-Daley, L.A. (2014). Differential LRRK2 Expression in the Cortex, Striatum, and Substantia Nigra in Transgenic and Nontransgenic Rodents. *J. Comp. Neurol.* 522, 2465–2480.

Xiong, Y., Neifert, S., Karuppagounder, S.S., Stankowski, J.N., Lee, B.D., Grima, J.C., Chen, G., Ko, H.S., Lee, Y., Swing, D., et al. (2017). Overexpression of Parkinson's Disease-Associated Mutation LRRK2 G2019S in Mouse Forebrain Induces Behavioral Deficits and  $\alpha$ -Synuclein Pathology. *ENeuro* 4, 1–10.

Zala, D., Hinkelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular Glycolysis Provides On-Board Energy for Fast Axonal Transport. *Cell* 152, 479–491.

Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Uéda, K., Yu, S., and Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of  $\alpha$ -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Res.* 1244, 40–52.

Zhao, J., Molitor, T.P., Langston, J.W., and Nichols, R.J. (2015). LRRK2 dephosphorylation increases its ubiquitination. *Biochem. J.* 469, 107–120.

Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., et al. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 552, 50–59.

## Chapitre IV. Discussion

Les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de la présente thèse confortent l'idée que les dérèglements neuronaux induits par la mutation G2019S de LRRK2 sont probablement subtiles. Ces observations sont en accord avec le fait que tous les porteurs de la mutation ne développent pas une MP et pour ceux qui développent la maladie, l'âge d'apparition est assez tardif, comme pour les formes sporadiques. Dans les modèles très simples, utilisés pour cette thèse (cellules en culture, transduction virale chez le rat), la protéine présentant la mutation est surexprimée à des taux bien supérieurs à ceux des niveaux endogènes, et malgré cela les déficits cellulaires engendrés sont assez minimes et requièrent *in vivo* des mois pour déclencher une mort neuronale détectable. Il est par ailleurs possible que la mort induite par la surexpression de LRRK2 nécessite l'ajout de mécanismes liés au vieillissement cérébral normal.

Nous avons étudié comment la surexpression de différentes formes de LRRK2 [LRRK2 entière, RCKWD40 et SRCKWD40 ( $\Delta$ LRRK2)] associées ou non à l' $\alpha$ syn A53T induisait des atteintes cellulaires (en particulier au niveau énergétique) ou rendait les cellules plus ou moins vulnérables à des stress mitochondriaux, mimant des facteurs de risque environnementaux identifiés pour la MP. Notre objectif a donc été d'identifier des mécanismes inhérents à la cellule (« cell-autonomous mechanisms ») en nous focalisant sur les mitochondries.

Nos résultats seront discutés sous un regard critique, en prenant en compte (i) les limites propres aux constructions moléculaires/transgènes utilisés, (ii) les conditions expérimentales nécessairement différentes suivant les questions posées, et (iii) les matériaux biologiques utilisés (HEK, neurones primaires, rats).

### **I. Activité et effet de l'expression de RCKWD40 et SRCKWD40 ( $\Delta$ LRRK2) *in vivo***

L'objectif global de ce projet était d'étudier l'effet de la protéine LRRK2, et de ses différents domaines, sur la toxicité de l' $\alpha$ syn. Une étude précédente du laboratoire comparant l'activité kinase de différents fragments de LRRK2 avait permis de montrer que son domaine C-ter (ROC-COR-KIN-WD40) présentait une activité kinase, qui était augmentée par la mutation G2019S (Figure 25). Cependant, il s'est avéré que ce fragment n'était pas capable de phosphoryler Rab10, un substrat confirmé de LRRK2 (Steger et al. 2016), ce qui suggère que le domaine N-ter de LRRK2 est nécessaire à l'interaction entre les deux protéines. Il est donc important de noter que ce fragment permet l'étude de certains mécanismes liés au domaine C-ter de LRRK2, mais qu'il ne se comporte pas comme la protéine entière. Malgré tout, l'expression de ce fragment muté G2019S dans la SNpc de rats était suffisante pour induire une perte significative des neurones DA, alors que l'expression du fragment sauvage n'induisait pas de perte neuronale. Cette première étude a confirmé que le domaine C-ter de LRRK2 était suffisant à l'induction d'une toxicité dépendante de son activité kinase, après 25 semaines d'expression (Figure 26). Ainsi, la toxicité qu'il produirait *in vivo* mettrait en jeu son activité kinase et plus particulièrement le domaine WD40, domaine important pour les interactions protéine-protéine (Cresto



et al. 2019). Avant d'aborder la question de l'interaction entre ce domaine C-ter de LRRK2 et l' $\alpha$ syn, notre équipe avait optimisé ce fragment RCKWD40 en rajoutant les quelques AA nécessaires pour qu'il comporte la S1292 (S-ROC-COR-KIN-WD40). Cette S1292 est très couramment utilisée pour suivre l'évolution de l'activité kinase de LRRK2. En effet, sa phosphorylation est directement proportionnelle à l'activité kinase de LRRK2, et elle est donc augmentée par la mutation G2019S et diminuée par l'abolition de son activité kinase (Longo et al. 2017; Sheng et al. 2012). De plus, la substitution de cet AA diminue la toxicité du mutant G2019S, ce qui suggère un rôle important de cette S1292 dans la pathologie liée à LRRK2 (Sheng et al. 2012).

La co-expression de ce fragment optimisé, muté G2019S, avec l' $\alpha$ syn A53T dans la SNpc de rat induisait une augmentation significative de la mort neuronale induite par l' $\alpha$ syn A53T après 15 semaines d'expression (Figure 28) (Cresto et al. En préparation). Une interaction fonctionnelle entre l' $\alpha$ syn et LRRK2 avait déjà été montrée dans la littérature (revue, Cresto et al., 2019). L'étude de notre équipe a permis de démontrer que le domaine C-ter de LRRK2 était suffisant pour que cette interaction fonctionnelle ait lieu. Au cours de ma thèse, nous avons abordé la question du mécanisme par lequel  $\Delta$ LRRK2 G2019S potentialisait la mort cellulaire induite par l' $\alpha$ syn, en nous concentrant en particulier sur les dysfonctionnements mitochondriaux.

## **II. Absence de toxicité de $\Delta$ LRRK2 et de l' $\alpha$ syn *in vitro***

Pour étudier *in vitro* le mécanisme de l'interaction fonctionnelle entre l' $\alpha$ syn et  $\Delta$ LRRK2, nous avons transduit des neurones primaires de cortex de rat avec des LV codant pour l' $\alpha$ syn WT/A53T et  $\Delta$ LRRK2 WT/G2019S/DK. L'emploi de ces 3 formes différentes de  $\Delta$ LRRK2 avait pour but de pouvoir distinguer si les effets observés étaient liés à l'activité kinase du fragment ou pas. Après avoir confirmé que cette méthode permettait une bonne expression des deux protéines dans les neurones, nous avons évalué la viabilité cellulaire ainsi que l'homéostasie mitochondriale par la mesure du taux d'ATP et du potentiel de membrane mitochondrial. Nous n'avons cependant pu mettre en évidence, ni de toxicité de l' $\alpha$ syn A53T par rapport à l' $\alpha$ syn WT, ni d'effet de la co-expression des différentes formes de  $\Delta$ LRRK2.

Nous avons supposé que cela pourrait être dû à l'absence du contexte dopaminergique dans nos cultures. En effet, la dégénérescence préférentielle des neurones DA de la SNpc dans la MP pourrait s'expliquer en partie par le fait que les neurones dopaminergiques sont particulièrement exposés à des ROS provenant du métabolisme de la DA cytosolique (Tabrez et al. 2012). Nous avons donc cherché à reproduire artificiellement ce stress oxydant dans les neurones primaires de cortex, en nous basant sur l'hypothèse mitochondriale de la MP. Cette dernière vient de plusieurs observations, notamment la démonstration d'un déficit sélectif du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale chez des patients atteints de la MP (Mizuno et al. 1989; Schapira et al. 1990). De plus, chez l'homme, l'inhibition sélective de ce complexe I par des toxines mitochondriales comme le MPTP ou la roténone induit une dysfonction mitochondriale, et notamment un stress oxydant, induisant la dégénérescence sélective des neurones DA de la SNpc et un

syndrome parkinsonien (Langston et Ballard 1983; Schapira 2008). Ces toxines mitochondriales sont donc un très bon outil pour reproduire *in vitro* un stress oxydant pertinent dans le contexte de la MP.

Le MPTP nécessitant la présence du transporteur dopaminergique pour pénétrer dans les cellules (Goldman 2014), nous avons décidé d'utiliser de la roténone. Cependant ni un stress aigu ni un stress chronique n'ont permis de révéler de sensibilité différentielle, ni de l' $\alpha$ syn A53T par rapport à l' $\alpha$ syn WT, ni de  $\Delta$ LRKK2. Nous pensons observer à minima une toxicité de l' $\alpha$ syn A53T par rapport à l' $\alpha$ syn WT. En effet, en 2012, Butler et collaborateurs avaient employé un modèle similaire au notre pour étudier la toxicité de l' $\alpha$ syn *in vitro*. Ils avaient surexprimé l' $\alpha$ syn A53T dans des cultures primaires de neurones corticaux de rat, en les infectant à 1 DIV avec des LV. Après 6 jours d'expression, l' $\alpha$ syn A53T n'induisait pas de mort cellulaire. Ils avaient donc traité les cellules avec 1 $\mu$ M de roténone pendant 16h, et avaient observé une diminution significative de la viabilité cellulaire dans les cellules co-exprimant l' $\alpha$ syn A53T et le GFP par rapport à des cellules exprimant uniquement du GFP (Butler et al. 2012). Cependant, leur étude a été réalisée dans des neurones non matures (< 10 DIV), et la concentration de roténone qu'ils ont utilisée était très élevée. Entre nos mains, une exposition de 24h à 100nM de roténone était déjà suffisante pour induire une très forte mort cellulaire (~75%). La différence de maturité entre nos deux modèles pourrait peut-être expliquer cette différence de sensibilité à la roténone et à l' $\alpha$ syn A53T. Notre choix de travailler dans des neurones matures était motivé par la volonté de nous placer dans les conditions les plus proches possibles de la physiologie du cerveau adulte. Il a en effet été montré que les neurones primaires matures présentaient des différences fonctionnelles avec les neurones immatures, notamment qu'ils utilisaient des mécanismes moléculaires différents pour l'apoptose (Lesuisse et Martin 2002). Il y aurait aussi des différences dans la fonctionnalité synaptique en fonction de la maturité neuronale. Dans des cultures primaires de neurones corticaux de rats, l'expression de la synaptophysine (marqueur pré-synaptique) et de PSD-95 (marqueur post-synaptique) est bien plus faible lorsqu'ils sont immatures (5 DIV) que lorsqu'ils sont matures (12 DIV) ce qui indique un développement des synapses au cours de la maturation des neurones en culture (Chang et Reynolds 2006). De plus, les neurones ne présentaient pas d'activité synaptique à 5 DIV alors qu'elle était apparente à 14 DIV (Chang et Reynolds 2006). L' $\alpha$ syn étant une protéine pré-synaptique, il nous semblait plus pertinent d'étudier sa toxicité dans des neurones présentant des synapses matures.

Dans des cultures primaires d'astrocytes de rats immortalisés, il a été montré que la surexpression de l' $\alpha$ syn (par transfection) WT et A53T induisait une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax après 6h d'exposition à 50nM de roténone par rapport à des cellules contrôle exprimant la GFP. Cependant l' $\alpha$ syn WT et A53T entraînaient la même toxicité dans ce modèle (Erustes et al. 2017). Une autre étude a montré que l' $\alpha$ syn WT et A53T induisaient une diminution significative du nombre de neurones TH+ dans des cultures primaires de mésencéphale de rat, mais sans aggravation par la mutation A53T par rapport à la forme sauvage (Koch et al. 2015).

Il est donc possible qu'*in vitro*, la toxicité de l' $\alpha$ syn ne soit due qu'à sa surexpression (de manière cohérente avec la toxicité induite par l'augmentation de l'expression de l' $\alpha$ syn chez les patients présentant des triplications de *SNCA* (Singleton et al. 2003)) et que la toxicité accrue de la mutation A53T ne soit retrouvée que dans un contexte *in vivo*, où l'environnement cérébral est plus complexe et les temps d'incubation bien plus longs. En effet, si les cultures neuronales *in vitro* sont un excellent outil pour étudier divers mécanismes cellulaires, elles présentent cependant l'inconvénient de ne pas reproduire la totalité de l'environnement cérébral. Les neurones corticaux de rats ont une activité synaptique en culture, en particulier lorsqu'ils sont cultivés dans du BrainPhys™ (Bardy et al. 2015), mais les synapses tripartites formées entre les neurones et les astrocytes sont essentielles au fonctionnement synaptique normal. Bien qu'il y ait des astrocytes dans les cultures primaires, il est possible qu'ils n'interagissent pas de manière physiologique avec les neurones et n'assurent pas leurs fonctions de manière optimale. L'absence de structure 3D et de vaisseaux sanguins, ainsi que des autres cellules gliales, modifie également la physiologie des cultures *in vitro*. Les neurones en culture ne récapitulent donc pas la totalité des fonctions des neurones *in vivo*.

En ce qui concerne LRRK2, une étude a montré que des drosophiles transgéniques exprimant LRRK2 G2019S présentaient une plus forte sensibilité à la roténone que les drosophiles exprimant LRRK2 WT (Ng et al. 2009), mais pour les raisons que l'on vient de citer, il est difficile de comparer les modèles *in vivo* et *in vitro*, d'autant plus que notre étude utilise le fragment C-ter de LRRK2 et non sa forme entière.

Malgré les différentes conditions expérimentales testées (avec ou sans roténone, traitements aigus ou chroniques, changement de milieu pour des conditions de culture plus proches de la physiologie), nous n'avons pas réussi à retrouver *in vitro* l'augmentation de la toxicité de l' $\alpha$ syn A53T induite par  $\Delta$ LRRK2 G2019S *in vivo*. Nous avons donc généré des constructions permettant l'expression de la protéine LRRK2 entière, et les avons comparées à  $\Delta$ LRRK2 sur le plan biochimique, afin d'essayer de comprendre l'origine de ces résultats.

### **III. Différences d'expression et d'activité entre $\Delta$ LRRK2 et LRRK2**

#### **A. Expression**

Nous avons donc transfecté les différentes formes de  $\Delta$ LRRK2 et de LRRK2 dans des cellules HEK, puis nous avons réalisé des western blots sur les extraits protéiques totaux afin de comparer l'expression de  $\Delta$ LRRK2 à celle de la protéine entière, ainsi que de différents marqueurs liés à l'activité kinase de LRRK2.

Cette comparaison dans des cellules HEK (Figure 39), ainsi que nos données obtenues dans les cultures primaires (Figure 2 du papier 3) nous ont permis de remarquer que, si  $\Delta$ LRRK2 avait le même niveau d'expression quelle que soit sa mutation, en revanche la forme DK de LRRK2 entière s'exprimait moins bien que les formes WT et G2019S. Il a été montré *in vivo* que des souris exprimant un variant sans activité kinase de LRRK2 présentaient une diminution de la protéine totale (Herzig et al. 2011), ce qui suggère que l'expression

de LRRK2 pourrait être régulée par son activité kinase. Un autre argument allant dans ce sens est le fait que l'inhibition prolongée de l'activité kinase de LRRK2 induit une diminution de la protéine totale (Fuji et al. 2015; Herzig et al. 2011; Lobbestael et al. 2016; Skibinski et al. 2014). Une explication possible serait que le blocage de l'activité kinase de LRRK2 serait associé à la diminution de la phosphorylation de sa S935, ce que nous avons montré pour LRRK2 DK à la fois dans les HEK et dans les neurones. Or la pS935 serait nécessaire pour l'interaction de LRRK2 avec les protéines 14-3-3, qui contrôleraient la localisation cellulaire de LRRK2 (Dzamko et al. 2010; Mamais et al. 2014; Nichols et al. 2010). Il a été montré que la perturbation de cette interaction induirait l'accumulation de LRRK2 dans des « pools » cytoplasmiques (Dzamko et al. 2010; Nichols et al. 2010) et augmenterait son ubiquitination et sa dégradation (Zhao et al. 2015). Il serait donc possible que la diminution de l'expression de LRRK2 en présence de la double mutation bloquant son activité kinase soit liée à une augmentation de sa dégradation. Cela pourrait expliquer que son niveau d'expression soit plus faible que celui de LRRK2 WT et G2019S, qui sont toutes deux fortement phosphorylées au niveau de cette S935. De plus,  $\Delta$ LRRK2 DK, qui ne possède pas cette S935, a le même niveau d'expression que  $\Delta$ LRRK2 WT et G2019S, dans les HEK comme dans les neurones, ce qui irait dans le sens d'un rôle de la présence de ce résidu dans la régulation de l'expression de LRRK2.

Cependant, il a aussi été montré que la substitution de la S935 par une alanine, empêchant sa déphosphorylation, n'empêchait pas la diminution de l'expression de LRRK2 induite par l'inhibition pharmacologique de son activité kinase (Lobbestael et al. 2016), ce qui signifie que le mécanisme de régulation de l'expression de LRRK2 est probablement bien plus complexe que cela. Quoiqu'il en soit, la plus faible expression de LRRK2 DK par rapport à LRRK2 WT et G2019S peut donc poser un problème d'interprétation des résultats, car il est difficile de discriminer entre des effets liés au niveau d'expression de la protéine et des effets liés à la diminution de l'activité kinase. Il serait donc intéressant par la suite d'utiliser un autre contrôle de l'activité kinase de LRRK2, en traitant les cellules transduites avec un inhibiteur, comme le MLI-2 par exemple.

## **B. Activité/phosphorylation**

En ce qui concerne l'activité kinase de  $\Delta$ LRRK2 et de LRRK2, ces expériences nous ont permis de montrer que LRRK2 était effectivement phosphorylée sur sa S1292, et ce de manière proportionnelle à son activité kinase, mais nous n'avons pas détecté de pS1292 avec  $\Delta$ LRRK2. Il est possible que la phosphorylation de LRRK2 sur cette sérine soit difficile à détecter car l'autophosphorylation de LRRK2 est relativement faible (Anand et al. 2009; Christensen, Smith, et Williamson 2017). Il serait donc possible que la phosphorylation de  $\Delta$ LRRK2 sur sa S1292 soit en dessous du seuil de sensibilité de la technique de western blot. Une autre hypothèse serait que la phosphorylation de cette sérine nécessiterait qu'elle soit incluse dans la totalité du domaine LRR de LRRK2.

Une autre méthode couramment utilisée pour étudier l'activité kinase de LRRK2 est la mesure de la phosphorylation de son substrat Rab10, qui serait proportionnelle à son activité kinase (Fan et al. 2018) bien qu'il y ait des résultats contradictoires (Liu et al. 2018). Dans l'article 1, nous avons montré que  $\Delta$ LRRK2 ne semblait pas interagir avec, et ne phosphorylait pas, Rab10 (Annexe I, Figure supplémentaire 2). En revanche, le fragment optimisé avec la S1292 semble très légèrement phosphoryler Rab10, mais dans une bien moindre proportion que la protéine entière (Figure 39). Cela est cohérent avec la littérature, car il a été montré que lorsque les S910 et 935 étaient déphosphorylées, l'interaction de LRRK2 avec Rab10 était plus faible et sa phosphorylation n'avait pas lieu, ce qui implique que le domaine N-ter (manquant à  $\Delta$ LRRK2) doit être essentiel à l'interaction avec Rab10 (Steger et al. 2017).  $\Delta$ LRRK2 semble donc présenter une activité kinase (montrée par l'étude au  $^{32}\text{P}$  du papier 1 et par la légère phosphorylation de Rab10), mais plus faible que celle de la protéine entière. Cela pourrait participer au fait que l'on ne retrouve pas la toxicité de  $\Delta$ LRRK2 G2019S dans les neurones *in vitro*. De plus l'absence du domaine N-ter induit la perte de l'interaction avec certains partenaires, comme Rab10 et les protéines 14-3-3, et diminuerait alors le spectre de l'activité du fragment. Couplé avec le fait que l'on travaille *in vitro*, tous ces paramètres pourraient diminuer les effets de  $\Delta$ LRRK2.

En effet, un autre facteur qui pourrait expliquer les disparités entre l'effet de  $\Delta$ LRRK2 et LRRK2 *in vivo* et *in vitro* est le fait que le contexte cérébral semble extrêmement important dans la pathologie liée à LRRK2. Il a été montré que l'expression cérébrale de LRRK2 était relativement faible par rapport à son expression dans les reins ou les poumons (Roosen et Cookson 2016). Cependant, la pathologie induite par les mutations de LRRK2 est restreinte au cerveau, et il a été montré que la protéine LRRK2 extraite du cerveau de souris transgéniques BAC exprimant LRRK2 avait une activité kinase plus élevée que la protéine LRRK2 extraite des poumons de ces mêmes animaux (Li et al. 2007). Ces données suggèrent une activité de LRRK2 spécifique dans le cerveau par rapport aux autres organes, et soulignent l'importance du contexte cérébral dans la pathologie liée à LRRK2. Il est donc possible que  $\Delta$ LRRK2 G2019S ne soit toxique que dans un contexte cérébral complet que nous ne reproduisons pas *in vitro*. Dans ces conditions, l'étude *in vitro* de l'effet de  $\Delta$ LRRK2 nous semblait difficile, car nous ne saurions jamais si l'absence de toxicité était due à une innocuité du fragment ou à la perte d'interacteurs essentiels à sa pathogénicité. Nous avons donc décidé de mettre un terme à l'étude *in vitro* de  $\Delta$ LRRK2 et de nous concentrer sur la protéine entière.

#### **IV. Effets *in vitro* de l'expression de LRRK2**

##### **A. LRRK2 et phosphorylation de l' $\alpha$ syn**

Notre objectif était donc de voir si LRRK2 était capable de moduler la toxicité de l' $\alpha$ syn dans des neurones *in vitro*. Nous voulions particulièrement aborder les mécanismes mitochondriaux de cette toxicité, car la mitochondrie est au centre de la physiopathologie de la MP.

Après avoir établi que nos constructions permettaient l'expression d'une protéine LRRK2 avec une activité kinase modulée par les différents variants, nous avons utilisé des LV pour les co-exprimer avec l' $\alpha$ syn A53T, en utilisant un LV-LacZ comme contrôle de charge virale. Après 13 jours d'expression (14 DIV) nous avons confirmé par western blot et par immunofluorescence que les deux protéines s'exprimaient bien dans les neurones. LRRK2 avait plutôt une expression somatique, alors que l' $\alpha$ syn s'exprimait plutôt dans les neurites. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, puisque l' $\alpha$ syn est une protéine pré-synaptique (Iwai et al. 1995; Luc Maroteaux, Campanelli, et Scheller 1988) alors que LRRK2 est plutôt somatique (Smith, Pei, et al. 2005; West et al. 2014b).

Comme la phosphorylation de l' $\alpha$ syn au niveau de sa S129 est fortement augmentée dans la MP, nous avons ensuite évalué si nous pouvions détecter ce marqueur pathologique dans notre modèle. Nous avons ainsi pu observer par immunofluorescence que la surexpression de l' $\alpha$ syn A53T était associée à l'apparition d'un marquage pS129+ neuronal diffus, préférentiellement au niveau somatique. Le comptage du nombre de neurones positifs pour la pS129 par rapport au nombre de neurones total (identifiés par un marquage NeuN) nous a permis de montrer que la proportion de neurones pS129+ était significativement augmentée par la co-expression de LRRK2 G2019S. Cette augmentation n'était pas retrouvée avec la forme WT, et elle était bloquée lorsque l'activité kinase de LRRK2 G2019S était inhibée par l'ajout de la mutation D1994 (DK). Cette augmentation du marquage pour l' $\alpha$ syn pS129 n'était pas associée à de la mort cellulaire. Ces résultats semblent indiquer que LRRK2 G2019S augmenterait, de manière directe ou indirecte, la phosphorylation de l' $\alpha$ syn. D'après la littérature, il est cependant très improbable que LRRK2 phosphoryle directement l' $\alpha$ syn.

De plus, plusieurs études ont montré un effet de LRRK2 G2019S sur la phosphorylation de l' $\alpha$ syn. Le premier est celui de Lin et collaborateurs, publié en 2009. En effet, ils ont montré par western blot une diminution significative de l' $\alpha$ syn pS129 totale dans les homogénats de cerveaux de souris double transgéniques  $\alpha$ syn A53T/ LRRK2 G2019S âgées de 1 mois par rapport à des souris exprimant uniquement l' $\alpha$ syn A53T. Cet article a également montré une augmentation de la relocalisation somatique de l' $\alpha$ syn dans le ST des souris  $\alpha$ syn A53T/ LRRK2 G2019S ainsi qu'une augmentation de l' $\alpha$ syn insoluble (Lin et al. 2009). Pour résumer, ils ont montré que LRRK2 G2019S augmentait la redistribution somatique de l' $\alpha$ syn, favorisant son agrégation et diminuant la quantité d' $\alpha$ syn pS129 soluble chez des animaux âgés de 1 mois. Dans notre modèle de neurones *in vitro*, nous n'avons pas observé d'agrégats d' $\alpha$ syn. En revanche, nous avons observé une augmentation du nombre de neurones présentant un marquage  $\alpha$ syn pS129 diffus en présence de LRRK2 G2019S. Cette localisation somatique de la pS129  $\alpha$ syn, par opposition à l' $\alpha$ syn qui était plutôt localisée dans les neurites, semble indiquer une redistribution de l' $\alpha$ syn phosphorylée. Il est possible que le modèle de Lin et collaborateurs soit plus sévère que le nôtre, puisqu'ils ont retrouvé une mort cellulaire significative chez les animaux co-exprimant l' $\alpha$ syn A53T et LRRK2 G2019S. Si l'on considère que notre modèle est plutôt précoce,

alors l'accumulation somatique d' $\alpha$ syn pS129 pourrait précéder son agrégation, et ce phénomène entraînerait la diminution de l' $\alpha$ syn pS129 soluble observée par Lin et collaborateurs car elle serait piégée dans les agrégats.

D'autres études ont également montré une augmentation de l' $\alpha$ syn pS129 en présence de LRRK2 G2019S. Chez des animaux exprimant LRRK2 G2019S, il a été montré qu'il y avait une augmentation significative des inclusions positives pour l' $\alpha$ syn pS129 dans la SNpc, 1 mois après l'injection de fibres d' $\alpha$ syn (Laura A. Volpicelli-Daley et al. 2016). Ces résultats ont également été reproduits dans des neurones primaires issus de souris transgéniques exprimant LRRK2 G2019S (Bieri et al. 2019; Volpicelli-daley et al. 2016). De manière surprenante, une autre équipe a confirmé ces observations dans des neurones primaires d'hippocampe de souris G2019S, mais pas dans des cultures primaires de mésencéphale, suggérant un rôle important de l'environnement cellulaire dans la pathologie liée à l' $\alpha$ syn (Henderson et al. 2018).

Le rôle exact de la phosphorylation de l' $\alpha$ syn à sa S129 n'est pas très bien compris, car des résultats discordants ont été obtenus par différentes équipes (Buck et al. 2015; Oueslati et al. 2013; Sato et al. 2011). Cependant, il a été suggéré que cette modification post-traductionnelle pourrait être impliquée dans l'adressage de l' $\alpha$ syn aux systèmes de dégradation (Machiya et al. 2010). De plus, il a été montré que dans les neurones, le processus de dégradation par autophagie passait par un transport rétrograde des autophagosomes le long de l'axone jusqu'au soma, où ils fusionnent avec les lysosomes pour que leur cargo soit dégradé (Maday et Holzbaur 2016). Si la pS129 était bien un signal d'adressage de l' $\alpha$ syn aux systèmes de dégradation, alors cela pourrait expliquer la relocalisation somatique que nous avons observée dans les neurones. En conditions pathologiques, une altération de la dégradation de cette  $\alpha$ syn phosphorylée pourrait mener à son accumulation et à la formation des CL caractéristiques. Il a en effet été montré qu'à la fois l' $\alpha$ syn A53T et LRRK2 G2019S pouvaient bloquer le processus d'autophagie (Cuervo et al. 2004; Orenstein et al. 2013). Nous n'avons pas observé d'agrégats d' $\alpha$ syn dans les neurones à 14 DIV. Il est possible que ce phénomène d'agrégation nécessite une période d'incubation plus longue pour se mettre en place. D'autres éléments, que nous avons déjà détaillés dans la discussion de l'article 3, pourraient expliquer cette observation. Notamment, le fait que l' $\alpha$ syn de rongeur présente physiologiquement une thréonine en position 53 pourrait rendre cette espèce moins sensible à la toxicité de l' $\alpha$ syn A53T humaine, et effectivement cette dernière est plus toxique chez des animaux KO pour l' $\alpha$ syn que chez des animaux sauvages (Cabin et al. 2005). De plus, comme nous l'avons expliqué précédemment avec  $\Delta$ LRRK2, il est probable que l'absence de structure tridimensionnelle, des vaisseaux sanguins et de la glie dans les cultures *in vitro* par rapport à l'environnement cérébral diminue la pathologie induite par l' $\alpha$ syn.

Quoiqu'il en soit, même si l'expression de l' $\alpha$ syn A53T et de LRRK2 dans des neurones primaires de rat n'induit pas de mort cellulaire, la relocalisation somatique de l' $\alpha$ syn pS129 et le fait que LRRK2 G2019S augmente d'une manière dépendante de son activité kinase le nombre de neurones pS129+ indique l'existence d'un mécanisme pathogène influencé par LRRK2.

## B. LRRK2 et mitochondrie

Nous avons ensuite voulu savoir si cette augmentation de l' $\alpha$ syn pS129 était associée à une dysfonction mitochondriale. Pour cela, nous avons évalué deux grands aspects de l'homéostasie mitochondriale : le métabolisme énergétique et la dynamique.

En ce qui concerne le métabolisme énergétique, nous n'avons pas observé de différences dans le taux d'ATP, le potentiel de membrane mitochondrial, ni la respiration. Pour mesurer la respiration cellulaire, nous avons utilisé une machine, le seahorse (Agilent), qui permet la mesure du taux de consommation de l'oxygène en temps réel par des cellules vivantes. La respiration basale est d'abord mesurée, puis des drogues mitochondriales sont ajoutées une à une afin d'évaluer la contribution des différents composants de la chaîne respiratoire au taux de consommation de l' $O_2$ . Au cours de ma thèse, nous avons eu accès à un seahorse XFp, permettant la mesure de la respiration dans des plaques 8 puits. Nous sommes actuellement en train de répéter ces études de respiration avec un seahorse XF96, permettant la mesure de la respiration dans des plaques 96 puits, ce qui nous permet de comparer 3 conditions différentes en même temps ( $\alpha$ syn A53T + LacZ vs  $\alpha$ syn A53T + LRRK2 G2019S vs  $\alpha$ syn A53T + LRRK2 DK). Pour plus de détails sur le fonctionnement du seahorse, voir <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-seahorse-xf-analyzers-work>.

Cependant, maintenir un taux d'ATP et un potentiel de membrane mitochondrial stables est vital pour les cellules (Zorova et al. 2018). Il n'est donc pas surprenant qu'en l'absence de mort cellulaire, ces paramètres ne varient pas. Il a déjà été montré que la surexpression de l' $\alpha$ syn dans des neurones primaires entraînait une diminution significative du taux d'ATP, ce que nous ne reproduisons pas. Cependant, cette étude mesurait le taux d'ATP 6 jours post-transfection (Choubey et al. 2011) alors que nous avons étudié l'homéostasie mitochondriale après 12 jours d'expression des transgènes. De plus, cette étude a été faite dans des neurones non matures (< 10 DIV), ce qui rend la comparaison avec notre modèle d'autant plus difficile, car cette différence de maturité implique des différences des cellules dans la réponse aux stimuli. En particulier, il a été montré que les mitochondries des neurones immatures avaient des propriétés différentes de celles des neurones matures, afin de s'adapter à la forte demande énergétique induite par la synaptogenèse (augmentation de la vélocité et diminution de la taille) (Chang et Reynolds 2006).

En revanche, nous avons constaté que les cellules exprimant l' $\alpha$ syn A53T devaient produire plus d'ATP mitochondrial, pour maintenir un taux d'ATP constant, que les cellules co-exprimant LRRK2 WT ou G2019S, elles-mêmes produisant plus d'ATP que les cellules co-exprimant l' $\alpha$ syn A53T et LRRK2 DK. Cela pourrait indiquer que les cellules exprimant l' $\alpha$ syn A53T subiraient un stress, qui serait réduit par la co-expression de LRRK2. Il serait possible que LRRK2 aide à maintenir l'homéostasie mitochondriale, et le ferait de manière plus efficace quand son activité kinase est diminuée. Nous sommes partis du postulat que LRRK2 G2019S serait toxique, alors que LRRK2 WT ne le serait pas. Le fait que nous utilisons un modèle de surexpression est cependant à prendre en compte dans cette réflexion. En effet, nous avons montré par des méthodes



biochimiques que LRRK2 WT avait une activité kinase inférieure à celle de LRRK2 G2019S. Cependant, en conditions de surexpression, l'activité cumulée de la protéine LRRK2 WT est potentiellement supérieure à celle de la protéine endogène. Cela pourrait altérer sa fonction physiologique et bloquer ou augmenter l'induction de certaines voies de signalisation, d'une manière qui pourrait se rapprocher de l'effet de la mutation G2019S. Il est donc nécessaire d'envisager la possibilité que la surexpression de LRRK2 WT ne soit pas forcément représentative de l'activité de la protéine en conditions physiologiques.

Le deuxième aspect de l'homéostasie mitochondriale que nous avons étudié est la dynamique des mitochondries. En effet, dans les cellules les mitochondries forment un réseau et subissent en permanence des phénomènes de fusion/fission. Il a notamment été montré que l' $\alpha$ syn A53T induisait une fission des mitochondries (revue, Cresto et al., 2019) et une diminution de la protéine Mfn2 dans la moelle épinière de souris (Xie and Chung, 2012). Les données concernant l'effet de LRRK2 G2019S sur ces phénomènes de fusion/fission sont en revanche plus contradictoires. En effet, LRRK2 serait capable de phosphoryler la protéine DRP1, ce qui serait en partie responsable d'une fragmentation des mitochondries (Su et Qi 2013), et certains papiers ont montré que LRRK2 G2019S augmentait l'expression de cette protéine (Ho et al. 2018; Wang et al. 2012). A l'inverse, d'autres études ont montré que LRRK2 interférait avec le recrutement de DRP1 à la membrane mitochondriale externe (Bonello et al. 2019) et que c'était l'inhibition de son activité kinase qui induisait une fission des mitochondries (Saez-Atienzar et al. 2014). L'effet de LRRK2 et de son activité kinase sur la dynamique mitochondriale est donc débattu. Nous avons donc évalué par WB le niveau de phosphorylation et d'expression de DRP1, ainsi que d'autres protéines impliquées dans les processus de fission (Fis1) et de fusion (Mfn2) des mitochondries, mais nous n'avons observé aucune différence entre les conditions. Bien que l'expression totale des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale ne soit pas altérée, il serait possible que l' $\alpha$ syn et LRRK2 aient quand même un impact sur la dynamique mitochondriale par d'autres mécanismes. En effet, il a également été suggéré que LRRK2 G2019S pourrait augmenter la fission des mitochondries en augmentant la localisation de DRP1 à la mitochondrie sans modifier son niveau d'expression (Niu et al. 2012; Y.-C. Su et Qi 2013). Nous sommes donc actuellement en train de réaliser des comptages du nombre de neurones présentant des mitochondries fragmentées, afin d'étudier l'effet de la co-expression de l' $\alpha$ syn A53T et de LRRK2 sur la morphologie des mitochondries. Comme les données concernant l'effet de LRRK2 sur les phénomènes de fusion/fission des mitochondries sont discordantes, il est possible que soit LRRK2 G2019S soit LRRK2 DK augmente la fission induite par l' $\alpha$ syn A53T.

Enfin, nous avons évalué la vitesse de déplacement des mitochondries dans des neurones jeunes (4-5 DIV), pour des raisons déjà expliquées dans la discussion de l'article 3. Les mitochondries des neurones immatures seraient plus mobiles afin de répondre aux plus fortes demandes énergétiques des neurones en maturation, induites notamment par la synaptogenèse (Chang et Reynolds 2006). Nous étions limités à l'étude de 4 conditions différentes, et nous avons choisi de comparer la vitesse des mitochondries entre des cellules transduites avec un LV LacZ comme contrôle de l'effet de la transduction lentivirale, avec celles de cellules

exprimant l'αsyn A53T seule ou avec LRRK2 WT ou G2019S. Nous avons ainsi pu montrer que les mitochondries des cellules co-exprimant LRRK2 (WT ou G2019S) avec l'αsyn A53T se déplaçaient en moyenne sur des distances significativement plus grandes que celles des cellules exprimant seulement l'αsyn A53T. Dans des neurones dérivés d'iPS de patients, il a été montré que la mutation G2019S de LRRK2 retardait l'arrêt des mitochondries via une stabilisation de la protéine Miro (Hsieh et al. 2016). Cette dernière est une protéine de la membrane mitochondriale externe qui permet l'ancrage des mitochondries aux moteurs moléculaires. Le fait que les mitochondries se déplacent sur de plus grandes distances dans les cellules co-exprimant l'αsyn A53T et LRRK2 pourrait être la conséquence de cet ancrage prolongé des mitochondries aux moteurs moléculaires induit par LRRK2. Comme il a été expliqué précédemment, nous étions partis du postulat que LRRK2 WT était le meilleur contrôle par rapport à LRRK2 G2019S, mais le fait qu'il soit surexprimé pourrait quand même induire des effets au-delà de sa fonction physiologique, et donc prolonger l'ancrage des mitochondries aux moteurs moléculaires d'une manière semblable à LRRK2 G2019S. Il a également été suggéré que la toxicité de LRRK2 serait liée à son niveau d'expression plutôt qu'à son activité kinase (Skibinski et al. 2014), ce qui serait cohérent avec le fait que LRRK2 WT et G2019S ont les mêmes effets à la fois sur la production d'ATP mitochondrial et la distance de déplacement des mitochondries.

Au regard de ces résultats obtenus sur la production d'ATP mitochondrial, il aurait sans doute été plus intéressant de remplacer le groupe αsyn A53T + LRRK2 WT par un groupe αsyn A53T + LRRK2 DK. Nous sommes donc actuellement en train de refaire cette expérience avec ces nouveaux groupes.

## Chapitre V. Conclusion

Nous avons donc montré que la surexpression du fragment C-ter de LRRK2, avec la mutation G2019S, était suffisant à induire une toxicité *in vivo*, et qu'il pouvait également potentialiser la neurodégénérescence induite par l'αsyn A53T chez le rat. Nous n'avons cependant pas reproduit ces effets *in vitro* dans ces cultures primaires de neurones corticaux de rats, ce qui suggère que, si le domaine C-ter est suffisant pour induire une toxicité *in vivo*, ce n'est pas le cas dans le modèle *in vitro* que nous avons mis en place. La comparaison de l'activité kinase de ΔLRRK2 avec celle de la protéine entière nous a poussés à modifier notre étude afin de travailler avec LRRK2 entière.

Nous avons ainsi montré dans des neurones primaires de rat que LRRK2 G2019S augmentait l'accumulation somatique d'αsyn pS129 d'une manière dépendante de son activité kinase, confirmant l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'αsyn et LRRK2 dans ce modèle. Bien que ce stress n'induisait pas de toxicité mitochondriale marquée, et que les mitochondries étaient globalement capables de maintenir leur homéostasie, nous avons observé des différences dans le taux de production d'ATP et la distance moyenne parcourue par les mitochondries, entre les cellules exprimant l'αsyn A53T seule et celles co-exprimant des formes enzymatiquement actives de LRRK2. Ces données semblent indiquer un stress mitochondrial modéré, ce qui est cohérent avec l'absence de mort cellulaire. Ce modèle, avec une accumulation somatique d'αsyn pS129 sans agrégation, et une compensation du stress par les mitochondries, pourrait être envisagé comme un modèle précoce et peu sévère de la MP. Il serait très intéressant d'étudier plus en profondeur l'effet de l'αsyn et de LRRK2 sur la mitochondrie, et d'étudier si ces effets sont réversibles par l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2. En effet, si cette dernière permettait de bloquer des effets précoces de la co-expression de l'αsyn et de LRRK2, alors cela renforcerait leur intérêt dans la prise en charge de la MP, dès les stades les plus précoces.

## Chapitre VI. Perspectives

### I. La mitochondrie : aller plus loin

Comme il a été dit dans la discussion, nous sommes actuellement en train de refaire les expériences de mesure de la vélocité des mitochondries à 4-5 DIV, afin de comparer l'effet de LRRK2 DK sur la distance parcourue par les mitochondries en présence d' $\alpha$ syn A53T, par rapport à LRRK2 G2019S ou à un contrôle. Notre hypothèse est que les formes enzymatiquement actives de LRRK2 (WT et G2019S) pourraient retarder l'arrêt des mitochondries en stabilisant la protéine Miro, une protéine de la membrane mitochondriale externe qui permet l'ancrage des mitochondries aux moteurs moléculaires. Si cet effet était dépendant de l'activité kinase de LRRK2, il serait bloqué par la forme DK. Il serait également intéressant de réaliser un fractionnement sur des lysats totaux de neurones et de regarder la présence de Miro dans la fraction enrichie en mitochondries par rapport à la fraction cytosolique. Ce fractionnement nous permettrait également d'étudier plus en détails l'expression de protéines impliquées dans les phénomènes de fusion/fission des mitochondries comme par exemple DPR1. En effet, il semblerait que LRRK2 puisse impacter la localisation mitochondriale de DRP1 (Bonello et al. 2019; Niu et al. 2012; Su et Qi 2013). Nous sommes également en train de quantifier la fragmentation des mitochondries dans des neurones à 14 DIV. D'après la littérature, la co-expression de l' $\alpha$ syn et de LRRK2 devrait induire une fragmentation des mitochondries, qui pourrait être diminuée par l'expression de LRRK2 DK si cet effet était dépendant de l'activité kinase de LRRK2.

### II. Autophagie

Comme nous l'avons expliqué en introduction, l'autophagie est un des grands mécanismes cellulaires qui est altéré dans la MP. Nous avons observé une accumulation somatique d' $\alpha$ syn pS129 dans les neurones surexprimant l' $\alpha$ syn A53T. Le nombre de neurones présentant ce marquage était augmenté par la co-expression de LRRK2 G2019S, ce qui pourrait suggérer une altération des mécanismes de dégradation dans les neurones, dépendante de l'activité kinase de LRRK2. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail l'autophagie dans notre modèle, afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. De plus, il serait intéressant de reproduire cette expérience en traitant les cellules co-transduites avec un inhibiteur de l'activité kinase de LRRK2, comme le MLI-2 (Fell et al. 2015), afin de confirmer l'implication de l'activité kinase de LRRK2 dans l'augmentation du marquage  $\alpha$ syn pS129. Comme il a été suggéré que la quantité de protéine LRRK2 pourrait être toxique, au-delà de son activité kinase, le lien entre  $\alpha$ syn et LRRK2 pourrait être lié à l'homéostasie protéique plutôt qu'à un mécanisme de phosphorylation, ce qui renforce l'intérêt d'étudier le fonctionnement de la machinerie de dégradation dans notre modèle. Une autre thèse est actuellement en cours sur ce sujet,

avec pour objectif d'étudier l'effet de la co-expression de l' $\alpha$ syn et de LRRK2 sur le flux autophagique dans des neurones primaires.

### **III. Expression de LRRK2 et interaction avec les protéines 14-3-3**

L'observation de la plus faible expression de LRRK2 DK par rapport aux formes WT et G2019S nous a beaucoup intéressé. Le fait que cette différence ne soit pas retrouvée avec  $\Delta$ LRRK2 pourrait signifier que le fragment N-ter serait impliqué dans la régulation de l'expression de LRRK2. Lorsque nous avons mis au point les doses de LV à utiliser pour exprimer LRRK2, nous n'avions testé que deux doses (10 et 20ng de LV/100.000 cellules), sur la base des tests que nous avons réalisés précédemment avec  $\Delta$ LRRK2. Nous avons ainsi pu constater qu'à chacune de ces doses l'expression de LRRK2 DK était bien plus faible que celle des autres formes de LRRK2. Il serait cependant intéressant de répéter ces expériences avec une plus large gamme de doses. De plus, il semble exister un lien entre la pS935, l'interaction avec les protéines 14-3-3, et la localisation cellulaire de LRRK2. Il serait donc intéressant de regarder plus en détail l'expression de ces protéines dans notre modèle, et essayer de comprendre si elles sont vraiment liées à la plus faible expression de LRRK2 DK ou si cette protéine s'exprime moins bien pour d'autres raisons (mauvais repliement par exemple). Là aussi, les inhibiteurs de LRRK2 pourraient s'avérer utiles afin de confirmer ou d'infirmer nos hypothèses. Nos résultats préliminaires (non montrés) semblent indiquer que le traitement des neurones primaires de rat co-exprimant l' $\alpha$ syn et LRRK2 par 300nM de MLI-2 pendant 24h diminuerait l'expression de LRRK2 WT et G2019S. Le niveau d'expression de LRRK2 DK par rapport aux cellules traitées par le véhicule ne semblait pas modifié, mais cela est plus difficile à évaluer de par son plus faible niveau d'expression. Des expériences de co-immunoprécipitation de LRRK2 et des protéines 14-3-3 pourraient également nous indiquer si la forme DK interagit moins avec les protéines 14-3-3 et si cette interaction est modifiée par les inhibiteurs de LRRK2.

### **IV. Astrocytes**

Les astrocytes sont de plus en plus étudiés dans le contexte des maladies neurodégénératives. Il a notamment été montré par des études post-mortem qu'ils pouvaient accumuler de l' $\alpha$ syn dans la MP (Wakabayashi et al. 2000). Il a récemment été montré dans des astrocytes dérivés d'iPS de patients porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 qu'il y avait une altération de l'autophagie et une accumulation d' $\alpha$ syn par rapport à des astrocytes contrôle. La co-culture de neurones DA dérivés d'iPS contrôles avec ces astrocytes G2019S entraînait le transfert de l' $\alpha$ syn anormale des astrocytes vers les neurones, et une diminution du nombre de neurones DA, indiquant un rôle des astrocytes dans la pathologie liée à LRRK2 (di Domenico et al. 2019). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des astrocytes dans l'augmentation de l' $\alpha$ syn pS129 observée en présence de LRRK2 G2019S. Il serait possible de réaliser des cultures primaires d'astrocytes purs, de les

infecter avec les LV-LRRK2 et de les mettre au contact de cultures de neurones purs transduits avec le LV- $\alpha$ syn A53T. Ce dispositif permettrait de comparer la phosphorylation de l' $\alpha$ syn en présence d'astrocytes exprimant les différentes formes de LRRK2, et de voir si l'on retrouve l'augmentation du nombre de neurones positifs pour la pS129 lorsque ce sont les astrocytes spécifiquement qui expriment LRRK2 G2019S. Des études préliminaires sont actuellement en cours sur des cultures primaires d'astrocytes.

## V. $\Delta$ LRRK2

Avec le recul, nous avons réalisé que les paramètres mesurés dans la première partie de notre étude, qui n'étaient pas impactés par les différentes formes de  $\Delta$ LRRK2, n'étaient pas modifiés non plus par les différents mutants de la protéine entière (viabilité cellulaire, taux d'ATP, potentiel de membrane mitochondrial). La comparaison biochimique de l'activité de  $\Delta$ LRRK2 avec celle de l'activité de LRRK2 nous avait laissé penser que ces résultats négatifs étaient dus à la faible activité du fragment, et donc sa faible toxicité en dehors d'un contexte *in vivo*. Cela est possible. Cependant, maintenant que nous savons que la protéine entière n'impacte pas non plus ces paramètres, mais qu'elle modulerait en fait l'homéostasie mitochondriale d'une manière bien plus subtile, il serait très intéressant de reprendre les expériences avec  $\Delta$ LRRK2 et de mesurer son impact (en présence d' $\alpha$ syn A53T) sur la production mitochondriale d'ATP et sur la dynamique mitochondriale. Ces données permettraient de mieux caractériser le rôle des différents domaines de LRRK2.

## VI. *In vivo*

Comme nous l'avons expliqué dans la discussion, le contexte cérébral semble essentiel à la toxicité de  $\Delta$ LRRK2. Il serait donc très intéressant de retourner vers le modèle AAV développé par Noémie Cresto afin d'étudier chez le rat l'effet de  $\Delta$ LRRK2 et de l' $\alpha$ syn A53T sur l'homéostasie mitochondriale et le processus autophagique. Il serait aussi intéressant de réaliser des injections de ces AAV dans le ST afin de pouvoir disséquer cette structure et d'en extraire les protéines totales, pour réaliser des western blot. Une étude biochimique permettrait de vérifier l'impact de la coexpression de l' $\alpha$ syn et de  $\Delta$ LRRK2 sur différents paramètres, notamment l'expression des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et des marqueurs de l'autophagie (comme LC3 ou p62). Cela permettrait aussi de s'intéresser à l'activité kinase de  $\Delta$ LRRK2 *in vivo*. En effet, nous n'avons pas ou peu mesuré de phosphorylation de Rab10 par  $\Delta$ LRRK2 *in vitro*, et nous n'avons pas détecté la pS1292, mais il est possible que le contexte *in vivo* apporte des résultats différents.

L'étude *in vivo* de la protéine LRRK2 entière dans la SNpc est plus difficile par une approche virale, car elle nécessite l'emploi de LV qui ne transduisent qu'environ 30% de la SNpc. Une injection dans le ST, avec un

LV-GFP pour pouvoir disséquer la zone transduite, permettrait en revanche d'effectuer un punch de ST dont on pourrait extraire des protéines afin de réaliser des études biochimiques.

### I. Publications

**G2019S mutant LRRK2 increases  $\alpha$ -synuclein phosphorylation in primary neurons without overt mitochondrial toxicity.** En préparation.

Camille Gardier, Noémie Cresto, Marie-Claude Gaillard, Noëlle Dufour, Alexis-Pierre Bemelmans, Emmanuel Brouillet, Géraldine Liot

**The C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation is sufficient to produce neurodegeneration of dopaminergic neurons in vivo.** *Neurobiology of Disease*, 2019.

Noémie Cresto, Marie-Claude Gaillard, Camille Gardier, Francesco Gubinelli, Elsa Diguët, Déborah Bellet, Laurine Legroux, Julien Mitja, Gwenaëlle Auregan, Martine Guillermier, Charlène Josephine, Caroline Jan, Noëlle Dufour, Alain Joliot, Philippe Hantraye, Gilles Bonvento, Nicole Déglon, Alexis-Pierre Bemelmans, Karine Cambon, Géraldine Liot, Emmanuel Brouillet

**The Unlikely Partnership Between LRRK2 and  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease.** *The European Journal of Neuroscience*, 2019.

Noémie Cresto\*, Camille Gardier\*, Francesco Gubinelli, Marie-Claude Gaillard, Géraldine Liot, Andrew B West, Emmanuel Brouillet

**Overexpression of the C-terminal fragment of LRRK2 harboring the G2019S substitution in substantia nigra dopaminergic neurons increases the neurotoxicity of mutant A53T  $\alpha$ -synuclein in vivo.** En préparation.

Noémie Cresto, Camille Gardier, Marie-Claude Gaillard, Francesco Gubinelli, Charlène Josephine, Gwenaëlle Auregan, Martine Guillermier, Suéva Bernier, Caroline Jan, Pauline Gipchtein, Philippe Hantraye, Gilles Bonvento, Karine Cambon, Géraldine Liot, Alexis-Pierre Bemelmans, Emmanuel Brouillet

### II. Participations à des congrès – posters

**Alpha-synuclein and LRRK2's cooperation in mitochondrial dysfunctions in Parkinson's Disease (PD).**

- "World Parkinson Congress", 2019 – Kyoto, Japon
- "LRRK2 biennial meeting", 2018 – Padoue, Italie
- "HOPE 2018" – Lille, France
- "Meetochondrie" 2017 & 2018 – France

**LRRK2 et  $\alpha$ -synucléine: complices toxiques pour les neurones dopaminergiques?** Journée France Parkinson, 2017 – Paris, France.





## Bibliographie

---

Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Fariñas, D. Choi-Lundberg, W. H. Ho, P. E. Castillo, N. Shinsky, J. M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, et A. Rosenthal. 2000. « Mice Lacking Alpha-Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System ». *Neuron* 25(1):239-52.

Aboutit, Saïda, Luc Bousset, Frida Loria, Seng Zhu, Fabrice de Chaumont, Laura Pieri, Jean-Christophe Olivo-Marin, Ronald Melki, et Chiara Zurzolo. 2016. « Tunneling Nanotubes Spread Fibrillar A-synuclein by Intercellular Trafficking of Lysosomes ». *The EMBO Journal* 35(19):2120-38.

Alam, Parvez, Luc Bousset, Ronald Melki, et Daniel E. Otzen. 2019. «  $\alpha$ -Synuclein Oligomers and Fibrils: A Spectrum of Species, a Spectrum of Toxicities ». *Journal of Neurochemistry*.

Alegre-Abarrategui, Javier, Helen Christian, Michele M. P. Lufino, Ruxandra Mutihac, Lara Lourenço Venda, Olaf Ansorge, et Richard Wade-Martins. 2009. « LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model ». *Human Molecular Genetics* 18(21):4022-34.

Alessi, Dario R. et Esther Sammler. 2018. « LRRK2 kinase in Parkinson's disease ». *Science* 360(6384):36-37.

Anand, Vasanti S., Laurie J. Reichling, Kerri Lipinski, Wayne Stochaj, Weili Duan, Kerry Kelleher, Pooja Pungaliya, Eugene L. Brown, Peter H. Reinhart, Richard Somberg, Warren D. Hirst, Steven M. Riddle, et Steven P. Braithwaite. 2009. « Investigation of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 : Enzymological Properties and Novel Assays ». *The FEBS Journal* 276(2):466-78.

Anderson, John P., Donald E. Walker, Jason M. Goldstein, Rian de Laat, Kelly Banducci, Russell J. Caccavello, Robin Barbour, Jiping Huang, Kristin Kling, Michael Lee, Linnea Diep, Pamela S. Keim, Xiaofeng Shen, Tim Chataway, Michael G. Schlossmacher, Peter Seubert, Dale Schenk, Sukanto Sinha, Wei Ping Gai, et Tamie J. Chilcote. 2006. « Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of  $\alpha$ -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 281(40):29739-52.

Andres-Mateos, Eva, Rebeca Mejias, Masayuki Sasaki, Xiaojie Li, Brian M. Lin, Saskia Biskup, Li Zhang, Rebecca Banerjee, Bobby Thomas, Lichuan Yang, Guosheng Liu, M. Flint Beal, David L. Huso, Ted M. Dawson, et Valina L. Dawson. 2009. « Unexpected lack of hypersensitivity in LRRK2 knock-out mice to MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(50):15846-50.

Angot, Elodie, Jennifer A. Steiner, Christian Hansen, Jia-Yi Li, et Patrik Brundin. 2010. « Are Synucleinopathies Prion-like Disorders? » *The Lancet. Neurology* 9(11):1128-38.

Arranz, Amaia M., Lore Delbroek, Kristof Van Kolen, Marco R. Guimarães, Wim Mandemakers, Guy Daneels, Samer Matta, Sara Calafate, Hamdy Shaban, Pieter Baatsen, Pieter-Jan De Bock, Kris Gevaert, Pieter Vanden Berghe, Patrik Verstreken, Bart De Strooper, et Diederik Moechars. 2015. « LRRK2 Functions in

Synaptic Vesicle Endocytosis through a Kinase-Dependent Mechanism ». *Journal of Cell Science* 128(3):541–52.

Bae, Eun-Jin, Dong-Kyu Kim, Changyoun Kim, Michael Mante, Anthony Adame, Edward Rockenstein, Ayse Ulusoy, Michael Klinkenberg, Ga Ram Jeong, Jae Ryul Bae, Cheolsoo Lee, He-Jin Lee, Byung-Dae Lee, Donato A. Di Monte, Eliezer Masliah, et Seung-Jae Lee. 2018. « LRRK2 kinase regulates  $\alpha$ -synuclein propagation via RAB35 phosphorylation ». *Nature Communications* 9(1):3465.

Bardy, Cedric, Mark van den Hurk, Tameji Eames, Cynthia Marchand, Ruben V. Hernandez, Mariko Kellogg, Mark Gorris, Ben Galet, Vanessa Palomares, Joshua Brown, Anne G. Bang, Jerome Mertens, Lena Böhnke, Leah Boyer, Suzanne Simon, et Fred H. Gage. 2015. « Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(20):E2725-34.

Barker, Roger A., Malin Parmar, Lorenz Studer, et Jun Takahashi. 2017. « Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era ». *Cell Stem Cell* 21(5):569-73.

Barrett, JC, Sarah Hansoul, DL Nicolae, et JH Cho. 2008. « Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease ». *Nature genetics* 40(8):955-62.

Baughman, Joshua M. et Vamsi K. Mootha. 2006. « Buffering Mitochondrial DNA Variation ». *Nature Genetics* 38(11):1232-33.

Beccano-Kelly, Dayne A., Naila Kuhlmann, Igor Tatarnikov, Mattia Volta, Lise N. Munsie, Patrick Chou, Li-Ping Cao, Heather Han, Lucia Tapia, Matthew J. Farrer, et Austen J. Milnerwood. 2014. « Synaptic function is modulated by LRRK2 and glutamate release is increased in cortical neurons of G2019S LRRK2 knock-in mice ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.

Belluzzi, Elisa, Adriano Gonnelli, Maria-Daniela Cirnaru, Antonella Marte, Nicoletta Plotegher, Isabella Russo, Laura Civiero, Susanna Cogo, Maria Perèz Carrion, Cinzia Franchin, Giorgio Arrigoni, Mariano Beltramini, Luigi Bubacco, Franco Onofri, Giovanni Piccoli, et Elisa Greggio. 2016. « LRRK2 Phosphorylates Pre-Synaptic N-Ethylmaleimide Sensitive Fusion (NSF) Protein Enhancing Its ATPase Activity and SNARE Complex Disassembling Rate ». *Molecular Neurodegeneration* 11:1.

Bendor, Jacob T., Todd P. Logan, et Robert H. Edwards. 2013. « The Function of  $\alpha$ -Synuclein ». *Neuron* 79(6):1044–1066.

Berg, Daniela, Ronald B. Postuma, Bastiaan Bloem, Piu Chan, Bruno Dubois, Thomas Gasser, Christopher G. Goetz, Glenda M. Halliday, John Hardy, Anthony E. Lang, Irene Litvan, Kenneth Marek, José Obeso, Wolfgang Oertel, C. Warren Olanow, Werner Poewe, Matthew Stern, et Günther Deuschl. 2014. « Time to Redefine PD? Introductory Statement of the MDS Task Force on the Definition of Parkinson's Disease: Time to Redefine PD ». *Movement Disorders* 29(4):454-62.

Betarbet, Ranjita, Rosa M. Canet-Aviles, Todd B. Sherer, Pier G. Mastroberardino, Chris McLendon, Jin-Ho Kim, Serena Lund, Hye-Mee Na, Georgia Taylor, Neil F. Bence, Ron Kopito, Byoung Boo Seo, Takao Yagi, Akemi Yagi, Gary Klinefelter, Mark R. Cookson, et J. Timothy Greenamyre. 2006. « Intersecting Pathways to Neurodegeneration in Parkinson's Disease: Effects of the Pesticide Rotenone on DJ-1, Alpha-

Synuclein, and the Ubiquitin-Proteasome System ». *Neurobiology of Disease* 22(2):404-20.

Bido, Simone, Federico N. Soria, Rebecca Z. Fan, Erwan Bezaud, et Kim Tieu. 2017. « Mitochondrial division inhibitor-1 is neuroprotective in the A53T- $\alpha$ -synuclein rat model of Parkinson's disease ». *Scientific Reports* 7.

Bieri, Gregor, Michel Brahic, Luc Bousset, Julien Couthouis, Nicholas J. Kramer, Rosanna Ma, Lisa Nakayama, Marie Monbureau, Erwin Defensor, Birgitt Schüle, Mehrdad Shamloo, Ronald Melki, et Aaron D. Gitler. 2019. « LRRK2 Modifies  $\alpha$ -Syn Pathology and Spread in Mouse Models and Human Neurons ». *Acta Neuropathologica* 137(6):961-80.

Biskup, Saskia, Darren J. Moore, Fulvio Celsi, Shinji Higashi, Andrew B. West, Shaida A. Andrabi, Kaisa Kurkinen, Seong Woon Yu, Joseph M. Savitt, Henry J. Waldvogel, Richard L. M. Faull, Piers C. Emson, Reidun Torp, Ole P. Ottersen, Ted M. Dawson, et Valina L. Dawson. 2006. « Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain ». *Annals of Neurology* 60(5):557-69.

Biskup, Saskia et Andrew B. West. 2009. « Zeroing in on LRRK2-Linked Pathogenic Mechanisms in Parkinson's Disease ». *Biochim Biophys Acta*.

Blocq, C. et G. Marinescu. 1893. « Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiparétique symptomatique d'une tumeur du pédoncule cérébral. » *C. R. Cos. Biol.*, 105-11.

Bonello, Fiona, Sidi-Mohamed Hassoun, François Mouton-Liger, Yea Seul Shin, Adeline Muscat, Christelle Tesson, Suzanne Lesage, Philip M. Beart, Alexis Brice, Johannes Krupp, Jean-Christophe Corvol, et Olga Corti. 2019. « LRRK2 Impairs PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy via Its Kinase Activity: Pathologic Insights into Parkinson's Disease ». *Human Molecular Genetics*.

Bonifati, V., P. Rizzu, F. Squitieri, E. Krieger, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, C. M. van Duijn, B. Oostra, G. Meco, et P. Heutink. 2003. « DJ-1( PARK7), a Novel Gene for Autosomal Recessive, Early Onset Parkinsonism ». *Neurological Sciences* 24(3):159-60.

Botta-Orfila, Teresa, Mario Ezquerra, Pau Pastor, Rubén Fernández-Santiago, Claustré Pont-Sunyer, Yaroslau Compta, Oswaldo Lorenzo-Betancor, Lluís Samaranch, Maria José Martí, Francesc Valldeoriola, Matilde Calopa, Manel Fernández, Miquel Aguilar, Oriol De Fabregas, Jorge Hernández-Vara, et Eduard Tolosa. 2012. « Age at onset in LRRK2-associated PD is modified by SNCA variants ». *Journal of Molecular Neuroscience* 48(1):245-47.

Bousset, Luc, Laura Pieri, Gemma Ruiz-Arlandis, Julia Gath, Poul Henning Jensen, Birgit Habenstein, Karine Madiona, Vincent Olieric, Anja Böckmann, Beat H. Meier, et Ronald Melki. 2013. « Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains ». *Nature Communications* 4.

Braak, Heiko, Daniele Sandmann-Keil, WeiPing Gai, et Eva Braak. 1999. « Extensive Axonal Lewy Neurites in Parkinson's Disease: A Novel Pathological Feature Revealed by  $\alpha$ -Synuclein Immunocytochemistry ». *Neuroscience Letters* 3.

Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A. I. de Vos, Ernst N. H. Jansen Steur, et Eva Braak. 2003. « Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease ». *Neurobiology of Aging* 24(2):197-211.

Bravo-San Pedro, José M., Mireia Niso-Santano, Rubén Gómez-Sánchez, Elisa Pizarro-Estrella, Ana Aiastui-Pujana, Ana Gorostidi, Vicente Climent, Rakel López De Maturana, Rosario Sanchez-Pernaute, Adolfo López De Munain, José M. Fuentes, et Rosa A. González-Polo. 2013. « The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(1):121-36.

Brissaud, E. 1895. *Leçons sur les maladies nerveuses. Recueillies et publiées par Henry Meige*. Masson et Cie.

Brockmann, Kathrin, Claudia Schulte, Ann-Kathrin Hauser, Peter Lichtner, Heiko Huber, Walter Maetzler, Daniela Berg, et Thomas Gasser. 2013. « SNCA: Major Genetic Modifier of Age at Onset of Parkinson's Disease ». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 28(9):1217-21.

Brundin, Patrik, Graham Atkin, et Jennifer T. Lamberts. 2015. « Basic Science Breaks through: New Therapeutic Advances in Parkinson's Disease: Basic Science Uncovers New Therapies for PD ». *Movement Disorders* 30(11):1521-27.

Brundin, Patrik, Ronald Melki, et Ron Kopito. 2010. « Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(4):301-7.

Buck, Kerstin, Natalie Landeck, Ayse Ulusoy, Nour K. Majbour, Omar M. A. El-Agnaf, et Deniz Kirik. 2015. « Ser129 phosphorylation of endogenous  $\alpha$ -synuclein induced by overexpression of polo-like kinases 2 and 3 in nigral dopamine neurons is not detrimental to their survival and function ». *Neurobiology of Disease* 78:100-114.

Burré, Jacqueline. 2015. « The synaptic function of alpha-synuclein ». *Journal of Parkinson's Disease* 5(4):699-713.

Burré, Jacqueline, Manu Sharma, et Thomas C. Südhof. 2018. « Cell Biology and Pathophysiology of  $\alpha$ -Synuclein ». *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8(3).

Burré, Jacqueline, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark R. Etherton, et Thomas C. Südhof. 2010. «  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro ». *Science* 329(5999):1663-67.

Burté, Florence, Valerio Carelli, Patrick F. Chinnery, et Patrick Yu-Wai-Man. 2015. « Disturbed Mitochondrial Dynamics and Neurodegenerative Disorders ». *Nature Reviews Neurology* 11(1):11-24.

Butler, Erin K., Aaron Voigt, A. Kathrin Lutz, Jane P. Toegel, Ellen Gerhardt, Peter Karsten, Björn Falkenburger, Andrea Reinartz, Konstanze F. Winklhofer, et Jörg B. Schulz. 2012. « The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-synuclein toxicity ». *PLoS Genetics* 8(2).

Cabezas, Ricardo, Marco Fidel Avila, Daniel Torrente, Ramon Santos El-bachá, Ludis Morales, Janneth Gonzalez, et George E. Barreto. 2013. « Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword ». « *Neurodegenerative Diseases* », book Chapter 20.

Cabin, Deborah E., Suzana Gispert-Sanchez, Diane Murphy, Georg Auburger, Robert R. Myers, et Robert L. Nussbaum. 2005. « Exacerbated Synucleinopathy in Mice Expressing A53T SNCA on a Snca Null

Background ». *Neurobiology of Aging* 26(1):25-35.

Caffrey, Tara M. et Richard Wade-Martins. 2007. « Functional MAPT Haplotypes: Bridging the Gap between Genotype and Neuropathology ». *Neurobiology of Disease* 27(1):1-10.

Calabresi, Paolo, Barbara Picconi, Alessandro Tozzi, Veronica Ghiglieri, et Massimiliano Di Filippo. 2014. « Direct and Indirect Pathways of Basal Ganglia: A Critical Reappraisal ». *Nature Neuroscience* 17(8):1022-30.

Carcaillon-Bentata, Laure, Alexis Elbaz, Frédéric Moisan, Sandrine Danet, et Valérie Olié. 2018. « Épidémiologie de la maladie de Parkinson, données nationales / Epidemiology of Parkinson's disease, French national data ». 43.

Cardo, Lucía F., Eliecer Coto, Lorena De Mena, René Ribacoba, Oswaldo Lorenzo-Betancor, Pau Pastor, LLuis Samaranch, Ignacio F. Mata, Marta Díaz, Germán Moris, Manuel Menéndez, Ana I. Corao, et Victoria Alvarez. 2012. « A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease ». *Journal of Molecular Neuroscience* 47(3):425–430.

Carlsson, A. 1959. « The Occurrence, Distribution and Physiological Role of Catecholamines in the Nervous System ». *Pharmacological Reviews* 11(2, Part 2):490-93.

Casarejos, M. J., J. Menéndez, R. M. Solano, J. A. Rodríguez-Navarro, J. García de Yébenes, et M. A. Mena. 2006. « Susceptibility to Rotenone Is Increased in Neurons from Parkin Null Mice and Is Reduced by Minocycline ». *Journal of Neurochemistry* 97(4):934-46.

Chandra, Sreenganga, Gilbert Gallardo, Rafael Fernández-Chacón, Oliver M. Schlüter, et Thomas C. Südhof. 2005. «  $\alpha$ -Synuclein Cooperates with CSP $\alpha$  in Preventing Neurodegeneration ». *Cell* 123(3):383-96.

Chang, D. T. W. et I. J. Reynolds. 2006. « Differences in Mitochondrial Movement and Morphology in Young and Mature Primary Cortical Neurons in Culture ». *Neuroscience* 141(2):727-36.

Charcot, Jean-Martin. 1872. *Leçons sur les maladies du système nerveux*. Vol. 1. A. Delahaye. Paris.

Chartier-Harlin, M. C., J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Levecque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer, et A. Destee. 2004. «  $\alpha$ -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease ». *Lancet* 364(9440):1167–1169.

Charvin, Delphine, Rossella Medori, Robert A. Hauser, et Olivier Rascol. 2018. « Therapeutic Strategies for Parkinson Disease: Beyond Dopaminergic Drugs ». *Nature Reviews Drug Discovery* 17(11):804-22.

Chen, Honglei et Beate Ritz. 2018. « The Search for Environmental Causes of Parkinson's Disease: Moving Forward » édité par P. Brundin, J. W. Langston, et B. R. Bloem. *Journal of Parkinson's Disease* 8(s1):S9-17.

Chen, Li et Mel B. Feany. 2005. «  $\alpha$ -Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease ». *Nature Neuroscience* 8(5):657-63.

Chen, Linan, Zhiguo Xie, Susie Turkson, et Xiaoxi Zhuang. 2015. « A53T Human  $\alpha$ -Synuclein Overexpression in Transgenic Mice Induces Pervasive Mitochondria Macroautophagy Defects Preceding

Dopamine Neuron Degeneration ». *Journal of Neuroscience* 35(3):890-905.

Chinta, Shankar J., Jyothi K. Mallajosyula, Anand Rane, et Julie K. Andersen. 2010. « Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo ». *Neuroscience Letters* 486(3):235-39.

Choubey, Vinay, Dzhamilja Safiulina, Annika Vaarmann, Michal Cagalinec, Przemyslaw Wareski, Malle Kuum, Alexander Zharkovsky, et Allen Kaasik. 2011. « Mutant A53T alpha-Synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy ». *Journal of Biological Chemistry* 286(12):10814-24.

Christensen, K. V., G. P. Smith, et D. S. Williamson. 2017. « Chapter Two - Development of LRRK2 Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease ». P. 37-80 in *Progress in Medicinal Chemistry*. Vol. 56, édité par D. R. Witty et B. Cox. Elsevier.

Chu, Yaping et Jeffrey H. Kordower. 2007. « Age-Associated Increases of Alpha-Synuclein in Monkeys and Humans Are Associated with Nigrostriatal Dopamine Depletion: Is This the Target for Parkinson's Disease? » *Neurobiology of Disease* 25(1):134-49.

Civiero, Laura, Susanna Cogo, Alice Bioss, et Elisa Greggio. 2018. « The Role of LRRK2 in Cytoskeletal Dynamics ». *Biochemical Society Transactions* 46(6):1653-63.

Civiero, Laura, Susanna Cogo, Anneleen Kiekens, Claudia Morganti, Isabella Tessari, Evy Lobbestael, Veerle Baekelandt, Jean-Marc Taymans, Marie-Christine Chartier-Harlin, Cinzia Franchin, Giorgio Arrigoni, Patrick A. Lewis, Giovanni Piccoli, Luigi Bubacco, Mark R. Cookson, Paolo Pinton, et Elisa Greggio. 2017. « PAK6 Phosphorylates 14-3-3 $\gamma$  to Regulate Steady State Phosphorylation of LRRK2 ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10(December):417.

Cole, Nelson B., Diane DiEuliis, Paul Leo, Drake C. Mitchell, et Robert L. Nussbaum. 2008. « Mitochondrial translocation of  $\alpha$ -synuclein is promoted by intracellular acidification ». *Experimental Cell Research* 314(10):2076-89.

Collier, Timothy J., Nicholas M. Kanaan, et Jeffrey H. Kordower. 2011. « Ageing as a Primary Risk Factor for Parkinson's Disease: Evidence from Studies of Non-Human Primates ». *Nature Reviews. Neuroscience* 12(6):359-66.

Conway, K. A. 2001. « Kinetic Stabilization of the alpha -Synuclein Protofibril by a Dopamine-alpha -Synuclein Adduct ». *Science* 294(5545):1346-49.

Cookson, Mark R. 2009. «  $\alpha$ -Synuclein and Neuronal Cell Death ». *Molecular Neurodegeneration* 4(1):9.

Corti, Olga, Suzanne Lesage, et Alexis Brice. 2011. « What Genetics Tells Us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease ». *Physiological Reviews* 91(4):1161-1218.

Covy, Jason P. et Benoit I. Giasson. 2009. « Identification of Compounds that Inhibit the Kinase Activity of Leucine-rich Repeat Kinase 2 ». *Biochemical and biophysical research communications* 378(3):473-77.

Cresto, Noémie, Marie-Claude Gaillard, Camille Gardier, Francesco Gubinelli, Elsa Diguët, Déborah Bellet, Laurine Legroux, Julien Mitja, Gwenaëlle Auregan, Martine Guillermier, Charlène Josephine, Caroline Jan, Noëlle Dufour, Alain Joliot, Philippe Hantraye, Gilles Bonvento, Nicole Déglon, Alexis-Pierre

Bemelmans, Karine Cambon, Géraldine Liot, et Emmanuel Brouillet. 2019. « The C-Terminal Domain of LRRK2 with the G2019S Mutation Is Sufficient to Produce Neurodegeneration of Dopaminergic Neurons in Vivo ». *Neurobiology of Disease* 104614.

Cresto, Noemie, Camille Gardier, Marie-Claude Gaillard, Francesco Gubinelli, Charlène Joséphine, Gwenaëlle Auregan, Martine Guillermier, Suéva Bernier, Caroline Jan, Pauline Gipchtein, Philippe Hantraye, Gilles Bonvento, Karine Cambon, Géraldine Liot, Alexis-Pierre Bemelmans, et Emmanuel Brouillet. En préparation. « Overexpression of the C-terminal fragment of LRRK2 harboring the G2019S substitution in substantia nigra dopaminergic neurons increases the neurotoxicity of mutant A53T  $\alpha$ -synuclein in vivo ».

Cresto, Noémie, Camille Gardier, Francesco Gubinelli, Marie-Claude Gaillard, Géraldine Liot, Andrew B. West, et Emmanuel Brouillet. 2019. « The Unlikely Partnership between LRRK2 and  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease ». *The European Journal of Neuroscience* 49(3):339-63.

Cuervo, Ana Maria, Leonidas Stefanis, Ross Fredenburg, Peter T. Lansbury, et David Sulzer. 2004. « Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. » *Science (New York, N.Y.)* 305(5688):1292-95.

Cuervo, Ana Maria et Esther Wong. 2014. « Chaperone-Mediated Autophagy: Roles in Disease and Aging ». *Cell Research* 24(1):92-104.

Cui, Guohong, Sang Beom Jun, Xin Jin, Michael D. Pham, Steven S. Vogel, David M. Lovinger, et Rui M. Costa. 2013. « Concurrent Activation of Striatal Direct and Indirect Pathways during Action Initiation ». *Nature* 494(7436):238-42.

Daher, J. P. L., L. A. Volpicelli-Daley, J. P. Blackburn, M. S. Moehle, et A. B. West. 2014. « Abrogation of -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(25):9289-94.

Daher, João P. L., Hisham A. Abdelmotilib, Xianzhen Hu, Laura A. Volpicelli-Daley, Mark S. Moehle, Kyle B. Fraser, Elie Needle, Yi Chen, Stefanus J. Steyn, Paul Galatsis, Warren D. Hirst, et Andrew B. West. 2015. « Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates  $\alpha$ -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration ». *Journal of Biological Chemistry* 290(32):19433-44.

Daher, Jo??o Paulo L., Olga Pletnikova, Saskia Biskup, Alessandra Musso, Sandra Gellhaar, Dagmar Galter, Juan C. Troncoso, Michael K. Lee, Ted M. Dawson, Valina L. Dawson, et Darren J. Moore. 2012. « Neurodegenerative phenotypes in an A53T ??-synuclein transgenic mouse model are independent of LRRK2 ». *Human Molecular Genetics* 21(11):2420-31.

Daniëls, V., V. Baekelandt, et J. M. Taymans. 2011. « On the Road to Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Signalling: Evidence from Cellular and in Vivo Studies ». *Neurosignals* 19(1):1-15.

Daubner, S. Colette, Tiffany Le, et Shanzhi Wang. 2011. « Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508(1):1-12.

Dauer, William, Nikolai Kholodilov, Miquel Vila, Anne-Cecile Trillat, Rose Goodchild, Kristin E. Larsen, Roland Staal, Kim Tieu, Yvonne Schmitz, Chao Annie Yuan, Marcelo Rocha, Vernice Jackson-Lewis, Steven Hersch, David Sulzer, Serge Przedborski, Robert Burke, et Rene Hen. 2002. « Resistance of alpha -



synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22):14524-29.

Dawson, Ted M., Han Seok Ko, et Valina L. Dawson. 2010. « Genetic animal models of Parkinson's disease. » *Neuron* 66(5):646–61.

De Wit, Tina, Veerle Baekelandt, et Evy Lobbstaël. 2018. « LRRK2 Phosphorylation: Behind the Scenes ». *The Neuroscientist* 24(5):486-500.

Del Rey, Natalia López-González, Ana Quiroga-Varela, Elisa Garbayo, Iria Carballo-Carbajal, Rubén Fernández-Santiago, Mariana H. G. Monje, Inés Trigo-Damas, María J. Blanco-Prieto, et Javier Blesa. 2018. « Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later ». *Frontiers in Neuroanatomy* 12.

Delzor, Aurélie, Noelle Dufour, Fanny Petit, Martine Guillermier, Diane Houitte, Gwennaëlle Auregan, Emmanuel Brouillet, Philippe Hantraye, et Nicole Déglon. 2012. « Restricted Transgene Expression in the Brain with Cell-Type Specific Neuronal Promoters ». *Human Gene Therapy Methods* 23(4):242-54.

Deng, Xianming, Nicolas Dzamko, Alan Prescott, Paul Davies, Qingsong Liu, Qingkai Yang, Jiing Dwan Lee, Matthew P. Patricelli, Tyzoon K. Nomanbhoy, Dario R. Alessi, et Nathanael S. Gray. 2011. « Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2 ». *Nature Chemical Biology* 7(4):203-5.

Desplats, P., H. J. Lee, E. J. Bae, C. Patrick, E. Rockenstein, L. Crews, B. Spencer, E. Masliah, et S. J. Lee. 2009. « Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31):13010-15.

Dettmer, Ulf, Andrew J. Newman, Frank Soldner, Eric S. Luth, Nora C. Kim, Victoria E. von Saucken, John B. Sanderson, Rudolf Jaenisch, Tim Bartels, et Dennis Selkoe. 2015. « Parkinson-causing  $\alpha$ -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. » *Nature communications* 6:7314.

Devi, Latha, Vijayendran Raghavendran, Badanavalu M. Prabhu, Narayan G. Avadhani, et Hindupur K. Anandatheerthavarada. 2008. « Mitochondrial import and accumulation of  $\alpha$ -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain ». *Journal of Biological Chemistry* 283(14):9089-9100.

Devoto, Victorio Martin Pozo, Nicolas Dimopoulos, Matías Alloatti, María Belén Pardi, Trinidad M. Saez, María Gabriela Otero, Lucas Eneas Cromberg, Antonia Marín-Burgin, Maria Elida Scassa, Gorazd B. Stokin, Alejandro F. Schinder, Gustavo Sevlever, et Tomás Luis Falzone. 2017. «  $\alpha$ synuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease ». *Scientific Reports* 7(1).

Di Fonzo, Alessio, Christan F. Rohé, Joaquim Ferreira, Hsin F. Chien, Laura Vacca, Fabrizio Stocchi, Leonor Guedes, Editio Fabrizio, Mario Manfredi, Nicola Vanacore, Stefano Goldwurm, Guido Breedveld, Cristina Sampaio, Giuseppe Meco, Egberto Barbosa, Ben A. Oostra, et Vincenzo Bonifati. 2005. « A Frequent LRRK2 Gene Mutation Associated with Autosomal Dominant Parkinson's Disease ». *The Lancet* 365(9457):412-15.

Di Maio, Roberto, Paul J. Barrett, Eric K. Hoffman, Caitlyn W. Barrett, Alevtina Zharikov, Anupom Borah, Xiaoping Hu, Jennifer McCoy, Charleen T. Chu, Edward A. Burton, Teresa G. Hastings, et J. Timothy Greenamyre. 2016. «  $\alpha$ -synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease ». *Science Translational Medicine* 8(342).

Di Maio, Roberto, Eric K. Hoffman, Emily M. Rocha, Matthew T. Keeney, Laurie H. Sanders, Briana R. De Miranda, Alevtina Zharikov, Amber Van Laar, Antonia F. Stepan, Thomas A. Lanz, Julia K. Kofler, Edward A. Burton, Dario R. Alessi, Teresa G. Hastings, et J. Timothy Greenamyre. 2018. « LRRK2 Activation in Idiopathic Parkinson's Disease ». *Science Translational Medicine* 10(451):eaar5429.

Dickson, Dennis W. 2007. « Linking Selective Vulnerability to Cell Death Mechanisms in Parkinson's Disease ». *The American Journal of Pathology* 170(1):16-19.

Dikiy, Igor et David Eliezer. 2014. « N-terminal Acetylation Stabilizes N-terminal Helicity in Lipid- and Micelle-bound  $\alpha$ -Synuclein and Increases Its Affinity for Physiological Membranes ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(6):3652-65.

Dodson, M. W., L. K. Leung, M. Lone, M. A. Lizzio, et M. Guo. 2014. « Novel ethyl methanesulfonate (EMS)-induced null alleles of the Drosophila homolog of LRRK2 reveal a crucial role in endolysosomal functions and autophagy in vivo ». *Disease Models & Mechanisms* 7(12):1351–1363.

Dodson, Mark W., Ting Zhang, Changan Jiang, Shengdi Chen, et Ming Guo. 2012. « Roles of the Drosophila LRRK2 homolog in Rab7-dependent lysosomal positioning ». *Human Molecular Genetics* 21(6):1350-63.

di Domenico, Angelique, Giulia Carola, Carles Calatayud, Meritxell Pons-Espinal, Juan Pablo Muñoz, Yvonne Richaud-Patin, Irene Fernandez-Carasa, Marta Gut, Armida Faella, Janani Parameswaran, Jordi Soriano, Isidro Ferrer, Eduardo Tolosa, Antonio Zorzano, Ana Maria Cuervo, Angel Raya, et Antonella Consiglio. 2019. « Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease ». *Stem Cell Reports*.

Dorsey, E. R., R. Constantinescu, J. P. Thompson, K. M. Biglan, R. G. Holloway, K. Kieburtz, F. J. Marshall, B. M. Ravina, G. Schifitto, A. Siderowf, et C. M. Tanner. 2007. « Projected Number of People with Parkinson Disease in the Most Populous Nations, 2005 through 2030 ». *Neurology* 68(5):384-86.

Doty, Richard L. 2012. « Olfactory Dysfunction in Parkinson Disease ». *Nature Reviews Neurology* 8(6):329-39.

Duffy, Megan F., Timothy J. Collier, Joseph R. Patterson, Christopher J. Kemp, Kelvin C. Luk, Malú G. Tansey, Katrina L. Paumier, Nicholas M. Kanaan, D. Luke Fischer, Nicole K. Polinski, Olivia L. Barth, Jacob W. Howe, Nishant N. Vaikath, Nour K. Majbour, Omar M. A. El-Agnaf, et Caryl E. Sortwell. 2018. « Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration ». *Journal of Neuroinflammation* 15(1):1-18.

Durcan, Thomas M. et Edward A. Fon. 2015. « The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications ». *Genes & Development* 29(10):989-99.

Dusonchet, Julien, Olexiy Kochubey, Klodjan Stafa, Samuel M. Young, Romain Zufferey, Darren J.

Moore, Bernard L. Schneider, et Patrick Aebischer. 2011. « A Rat Model of Progressive Nigral Neurodegeneration Induced by the Parkinson's Disease-Associated G2019S Mutation in LRRK2 ». *The Journal of Neuroscience* 31(3):907-12.

Dzamko, Nicolas, Maria Deak, Faycal Hentati, Alastair D. Reith, Alan R. Prescott, Dario R. Alessi, et R. Jeremy Nichols. 2010. « Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser 910 /Ser 935 , disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization ». *Biochemical Journal* 430(3):405-13.

Dzamko, Nicolas, Amanda M. Gysbers, Rina Bandopadhyay, Marc F. Bolliger, Akiko Uchino, Ye Zhao, Masaki Takao, Sandrine Wauters, Wilma D. J. van de Berg, Junko Takahashi-Fujigasaki, R. Jeremy Nichols, Janice L. Holton, Shigeo Murayama, et Glenda M. Halliday. 2017. « LRRK2 levels and phosphorylation in Parkinson's disease brain and cases with restricted Lewy bodies ». *Movement Disorders* 32(3):423-32.

Dzamko, Nicolas et Glenda M. Halliday. 2012. « An Emerging Role for LRRK2 in the Immune System ». *Biochemical Society Transactions* 40(5):1134-39.

Dzamko, Nicolas, Francisco Inesta-Vaquera, Jiazhen Zhang, Chengsong Xie, Huaibin Cai, Simon Arthur, Li Tan, Hwanguen Choi, Nathanael Gray, Philip Cohen, Patrick Pedrioli, Kristopher Clark, et Dario R. Alessi. 2012. « The IkappaB Kinase Family Phosphorylates the Parkinson's Disease Kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-Like Receptor Signaling ». *PLOS ONE* 7(6):e39132.

Dzamko, Nicolas L. 2017. « LRRK2 and the Immune System ». *Advances in Neurobiology* 14:123-43.

Eguchi, Tomoya, Tomoki Kuwahara, Maria Sakurai, Tadayuki Komori, Tetta Fujimoto, Genta Ito, Shin Ichiro Yoshimura, Akihiro Harada, Mitsunori Fukuda, Masato Koike, et Takeshi Iwatsubo. 2018. « LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2.

Ehringer, H. et O. Hornykiewicz. 1960. « Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system ». *Klinische Wochenschrift* 38:1236-39.

Eidelberg, David et D. James Surmeier. 2011. « Brain Networks in Huntington Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 121(2):484-92.

El-Agnaf, Omar M. A., Sultan A. Salem, Katerina E. Paleologou, Martin D. Curran, Mark J. Gibson, Jennifer A. Court, Michael G. Schlossmacher, et David Allsop. 2006. « Detection of Oligomeric Forms of Alpha-Synuclein Protein in Human Plasma as a Potential Biomarker for Parkinson's Disease ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(3):419-25.

Ellis, Christopher E., Eric J. Murphy, Drake C. Mitchell, Mikhail Y. Golovko, Fernando Scaglia, C. Gwendolyn, Robert L. Nussbaum, et Gwendolyn C. Barcelo. 2005. « Mitochondrial Lipid Abnormality and Electron Transport Chain Impairment in Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein Mitochondrial Lipid Abnormality and Electron Transport Chain Impairment in Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein  $\dagger$  ». 25(22):10190-201.

Engelender, Simone et Ole Isacson. 2017. « The Threshold Theory for Parkinson's Disease ». *Trends in Neurosciences* 40(1):4-14.

Erustes, Adolfo Garcia, Fernanda Yakel Stefani, Juliana Yoshie Terashima, Roberta Sessa Stilhano,

Priscila Totarelli Monteforte, Gustavo Jose da Silva Pereira, Sang Won Han, Andrana Karla Calgarotto, Yi-Te Hsu, Rodrigo Portes Ureshino, Claudia Bincoletto, et Soraya Soubhi Smaili. 2017. « Overexpression of alpha-synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. » *Journal of neuroscience research*.

Fan, Ying, Andrew J. M. Howden, Adil R. Sarhan, Pawel Lis, Genta Ito, Terina N. Martinez, Kathrin Brockmann, Thomas Gasser, Dario R. Alessi, et Esther M. Sammler. 2018. « Interrogating Parkinson's disease LRRK2 kinase pathway activity by assessing Rab10 phosphorylation in human neutrophils ». *Biochemical Journal* 475(1):23-44.

Fauchoux, Baptiste A., Marie-Elise Martin, Carole Beaumont, Jean-Jacques Hauw, Yves Agid, et Etienne C. Hirsch. 2003. « Neuromelanin Associated Redox-Active Iron Is Increased in the Substantia Nigra of Patients with Parkinson's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 86(5):1142-48.

Fauvet, Bruno, Mohamed-Bilal Fares, Filsy Samuel, Igor Dikiy, Anurag Tandon, David Eliezer, et Hilal A. Lashuel. 2012. « Characterization of Semisynthetic and Naturally N $\alpha$ -Acetylated  $\alpha$ -Synuclein in Vitro and in Intact Cells: Implications for Aggregation and Cellular Properties of  $\alpha$ -Synuclein ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(34):28243-62.

Fell, M. J., C. Mirescu, K. Basu, B. Cheewatrakoolpong, D. E. DeMong, J. M. Ellis, L. A. Hyde, Y. Lin, C. G. Markgraf, H. Mei, M. Miller, F. M. Poulet, J. D. Scott, M. D. Smith, Z. Yin, X. Zhou, E. M. Parker, M. E. Kennedy, et J. A. Morrow. 2015. « MLi-2, a Potent, Selective, and Centrally Active Compound for Exploring the Therapeutic Potential and Safety of LRRK2 Kinase Inhibition ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 355(3):397-409.

Flavin, William P., Luc Bousset, Zachary C. Green, Yaping Chu, Stratos Skarpathiotis, Michael J. Chaney, Jeffrey H. Kordower, Ronald Melki, et Edward M. Campbell. 2017. « Endocytic Vesicle Rupture Is a Conserved Mechanism of Cellular Invasion by Amyloid Proteins ». *Acta Neuropathologica* 134(4):629-53.

Fred Dice, J. 1990. « Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis ». *Trends in Biochemical Sciences* 15(8):305–309.

Freundt, Eric C., Nate Maynard, Eileen K. Clancy, Shyamali Roy, Luc Bousset, Yannick Sourigues, Markus Covert, Ronald Melki, Karla Kirkegaard, et Michel Brahic. 2012. « Neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils through axonal transport ». *Annals of neurology* 72(4):517-24.

Froula, Jessica M., Benjamin W. Henderson, Jose Carlos Gonzalez, Jada H. Vaden, John W. Mclean, Yumei Wu, Gokulakrishna Banumurthy, Linda Overstreet-Wadiche, Jeremy H. Herskowitz, et Laura A. Volpicelli-Daley. 2018. «  $\alpha$ -Synuclein fibril-induced paradoxical structural and functional defects in hippocampal neurons ». *Acta Neuropathologica Communications* 6(1):35.

Fuji, Reina N., Michael Flagella, Miriam Baca, Marco A. S. Baptista, Jens Brodbeck, Bryan K. Chan, Brian K. Fiske, Lee Honigberg, Adrian M. Jubb, Paula Katavolos, Donna W. Lee, Sock-Cheng Lewin-Koh, Tori Lin, Xingrong Liu, Shannon Liu, Joseph P. Lyssikatos, Jennifer O'Mahony, Mike Reichelt, Merone Roose-Girma, Zejuan Sheng, Todd Sherer, Ashley Smith, Margaret Solon, Zachary K. Sweeney, Jacqueline Tarrant, Alison Urkowitz, Søren Warming, Murat Yaylaoglu, Shuo Zhang, Haitao Zhu, Anthony A. Estrada,

et Ryan J. Watts. 2015. « Effect of Selective LRRK2 Kinase Inhibition on Nonhuman Primate Lung ». *Science Translational Medicine* 7(273):273ra15-273ra15.

Fujiwara, Hideo, Masato Hasegawa, Naoshi Dohmae, Akiko Kawashima, Eliezer Masliah, Matthew S. Goldberg, Jie Shen, Koji Takio, et Takeshi Iwatsubo. 2002. «  $\alpha$ -Synuclein Is Phosphorylated in Synucleinopathy Lesions ». *Nature Cell Biology* 4(2):160-64.

Funayama, Manabu, Kazuko Hasegawa, Hisayuki Kowa, Masaaki Saito, Shoji Tsuji, et Fumiya Obata. 2002. « A new locus for Parkinson's Disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1 ». *Annals of Neurology* 51(3):296–301.

Gaig, C., M. J. Marti, M. Ezquerra, M. J. Rey, A. Cardozo, et E. Tolosa. 2007. « G2019S LRRK2 Mutation Causing Parkinson's Disease without Lewy Bodies ». *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 78(6):626-28.

Gao, H. M., P. T. Kotzbauer, K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanowski, et V. M. Y. Lee. 2008. « Neuroinflammation and Oxidation/Nitration of  $\alpha$ -Synuclein Linked to Dopaminergic Neurodegeneration ». *Journal of Neuroscience* 28(30):7687-98.

Gardet, Agnès, Yair Benita, Chun Li, Bruce E. Sands, Isabel Ballester, Christine Stevens, Joshua R. Korzenik, John D. Rioux, Mark J. Daly, Ramnik J. Xavier, et Daniel K. Podolsky. 2010. « LRRK2 Is Involved in the IFN- $\gamma$  Response and Host Response to Pathogens ». *The Journal of Immunology* 185(9):5577–5585.

Gaven, Florence, Philippe Marin, et Sylvie Claeysen. 2014. « Primary Culture of Mouse Dopaminergic Neurons ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (91).

George, J. M., H. Jin, W. S. Woods, et D. F. Clayton. 1995. « Characterization of a Novel Protein Regulated during the Critical Period for Song Learning in the Zebra Finch ». *Neuron* 15(2):361-72.

Ghiglieri, Veronica, Valeria Calabrese, et Paolo Calabresi. 2018. « Alpha-synuclein: From early synaptic dysfunction to neurodegeneration ». *Frontiers in Neurology* 9(MAY).

Giaime, Emilie, Youren Tong, Lisa K. Wagner, Yang Yuan, Guodong Huang, et Jie Shen. 2017. « Age-Dependent Dopaminergic Neurodegeneration and Impairment of the Autophagy-Lysosomal Pathway in LRRK-Deficient Mice ». *Neuron* 96(4):796-807.e6.

Giasson, B. I., J. E. Duda, I. V. Murray, Q. Chen, J. M. Souza, H. I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee. 2000. « Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective Alpha-Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions ». *Science (New York, N.Y.)* 290(5493):985-89.

Giasson, B. I., I. V. Murray, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee. 2001. « A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of Alpha-Synuclein Is Essential for Filament Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(4):2380-86.

Giasson, Benoit I., Jason P. Covy, Nancy M. Bonini, Howard I. Hurtig, Matthew J. Farrer, John Q. Trojanowski, et Viviana M. Van Deerlin. 2006. « Biochemical and pathological characterization of Lrrk2 ». *Annals of Neurology* 59(2):315–322.

Giasson, Benoit I., John E. Duda, Shawn M. Quinn, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2002. « Neuronal  $\alpha$ -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human  $\alpha$ -

synuclein ». *Neuron* 34(4):521-33.

Giesert, Florian, Andreas Hofmann, Alexander Bürger, Julia Zerle, Karina Kloos, Ulrich Hafen, Luise Ernst, Jingzhong Zhang, Daniela Maria Vogt-Weisenhorn, et Wolfgang Wurst. 2013. « Expression Analysis of Lrrk1, Lrrk2 and Lrrk2 Splice Variants in Mice » édité par C. T. Chu. *PLoS ONE* 8(5):e63778.

Gilks, William P., Patrick M. Abou-Sleiman, Sonia Gandhi, Shushant Jain, Andrew Singleton, Andrew J. Lees, Karen Shaw, Kailash P. Bhatia, Vincenzo Bonifati, Niall P. Quinn, John Lynch, Daniel G. Healy, Janice L. Holton, Tamas Revesz, et Nicholas W. Wood. 2005. « A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease ». *Lancet* 365(9457):415–416.

Goldman, Samuel M. 2014. « Environmental Toxins and Parkinson's Disease ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54:141-64.

Gonçalves, Susana et Tiago Fleming Outeiro. 2013. « Assessing the Subcellular Dynamics of Alpha-synuclein Using Photoactivation Microscopy ». *Molecular Neurobiology* 47(3):1081-92.

González, Nazareno, Trinidad Arcos-López, Annekatriin König, Liliana Quintanar, Mauricio Menacho Márquez, Tiago F. Outeiro, et Claudio O. Fernández. 2019. « Effects of Alpha-Synuclein Post-Translational Modifications on Metal Binding ». *Journal of Neurochemistry*.

Gorbatyuk, Oleg S., Shoudong Li, Layla F. Sullivan, Weijun Chen, Galina Kondrikova, Fredric P. Manfredsson, Ronald J. Mandel, et Nicholas Muzyczka. 2008. « The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(2):763-68.

Gotthardt, Katja, Michael Weyand, Arjan Kortholt, Peter J. M. Van Haastert, et Alfred Wittinghofer. 2008. « Structure of the Roc-COR Domain Tandem of C. Tepidum, a Prokaryotic Homologue of the Human LRRK2 Parkinson Kinase ». *The EMBO Journal* 27(16):2239-49.

Grassi, Diego, Shannon Howard, Minghai Zhou, Natalia Diaz-Perez, Nicolai T. Urban, Debbie Guerrero-Given, Naomi Kamasawa, Laura A. Volpicelli-Daley, Philip LoGrasso, et Corinne Ida Lasmézas. 2018. « Identification of a highly neurotoxic  $\alpha$ -synuclein species inducing mitochondrial damage and mitophagy in Parkinson's disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201713849.

Greggio, Elisa, Shushant Jain, Ann Kingsbury, Rina Bandopadhyay, Patrick Lewis, Alice Kaganovich, Marcel P. van der Brug, Alexandra Beilina, Jeff Blackinton, Kelly Jean Thomas, Rili Ahmad, David W. Miller, Sashi Kesavapany, Andrew Singleton, Andrew Lees, Robert J. Harvey, Kirsten Harvey, et Mark R. Cookson. 2006. « Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin ». *Neurobiology of Disease* 23(2):329-41.

Greggio, Elisa, Ibarido Zambrano, Alice Kaganovich, Alexandra Beilina, Jean-Marc Taymans, Veronique Daniëls, Patrick Lewis, Shushant Jain, Jinhui Ding, Ali Syed, Kelly J. Thomas, Veerle Baekelandt, et Mark R. Cookson. 2008. « The Parkinson Disease-Associated Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 283(24):16906-14.

Gribaudo, Simona, Philippe Tixador, Luc Bousset, Alexis Fenyi, Patricia Lino, Ronald Melki, Jean-

Michel Peyrin, et Anselme L. Perrier. 2019. « Propagation of  $\alpha$ -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network ». *Stem Cell Reports*.

Grillner, Sten et Brita Robertson. 2015. « The Basal Ganglia Downstream Control of Brainstem Motor Centres—an Evolutionarily Conserved Strategy ». *Current Opinion in Neurobiology* 33:47-52.

Guardia-Laguarta, Cristina, Estela Area-Gomez, Cornelia Rüb, Yuhui Liu, Jordi Magrané, Dorothea Becker, Wolfgang Voos, Eric Schon, et Serge Przedborski. 2014. «  $\alpha$ -Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes ». *J Neurosci* 34(1):249-59.

Hallett, Penelope J., Oliver Cooper, Damaso Sadi, Harold Robertson, Ivar Mendez, et Ole Isacson. 2014. « Long-Term Health of Dopaminergic Neuron Transplants in Parkinson's Disease Patients ». *Cell Reports* 7(6):1755-61.

Hamza, Taye H., Cyrus P. Zabetian, Albert Tenesa, Alain Laederach, Jennifer Montimurro, Dora Yearout, Denise M. Kay, Kimberly F. Doheny, Justin Paschall, Elizabeth Pugh, Victoria I. Kusel, Randall Collura, John Roberts, Alida Griffith, Ali Samii, William K. Scott, John Nutt, Stewart A. Factor, et Haydeh Payami. 2010. « Common Genetic Variation in the *HLA* Region Is Associated with Late-Onset Sporadic Parkinson's Disease ». *Nature Genetics* 42(9):781-85.

Hassink, G. C., C. C. Raiss, I. M. J. Segers-Nolten, R. J. A. van Wezel, V. Subramaniam, J. le Feber, et M. M. A. E. Claessens. 2018. « Exogenous  $\alpha$ -synuclein hinders synaptic communication in cultured cortical primary rat neurons. » *PloS one* 13(3):e0193763.

Haute Autorité de Santé. 2016. « Guide du parcours de soin, Maladie de Parkinson ».

Healy, Daniel G., Mario Falchi, Sean S. O'Sullivan, Vincenzo Bonifati, Alexandra Durr, Susan Bressman, Alexis Brice, Jan Aasly, Cyrus P. Zabetian, Stefano Goldwurm, Joaquim J. Ferreira, Eduardo Tolosa, Denise M. Kay, Christine Klein, David R. Williams, Connie Marras, Anthony E. Lang, Zbigniew K. Wszolek, Jose Berciano, Anthony HV Schapira, Timothy Lynch, Kailash P. Bhatia, Thomas Gasser, Andrew J. Lees, et Nicholas W. Wood. 2008. « Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study ». *The Lancet Neurology* 7(7):583–590.

Helley, Martin P., Jennifer Pinnell, Carolina Sportelli, et Kim Tieu. 2017. « Mitochondria: A Common Target for Genetic Mutations and Environmental Toxicants in Parkinson's Disease ». *Frontiers in Genetics* 8.

Henderson, Michael X., Eli J. Cornblath, Adam Darwich, Bin Zhang, Hannah Brown, Ronald J. Gathagan, Raizel M. Sandler, Danielle S. Bassett, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2019. « Spread of  $\alpha$ -Synuclein Pathology through the Brain Connectome Is Modulated by Selective Vulnerability and Predicted by Network Analysis ». *Nature Neuroscience* 22(8):1248-57.

Henderson, Michael X., Chao Peng, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2018. « LRRK2 activity does not dramatically alter  $\alpha$ -synuclein pathology in primary neurons. » *Acta neuropathologica communications* 6(1):45.

Henderson, Michael X., Medha Sengupta, Ian McGeary, Bin Zhang, Modupe F. Olufemi, Hannah Brown, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2019. « LRRK2 Inhibition Does Not Impart Protection from  $\alpha$ -Synuclein Pathology and Neuron Death in Non-Transgenic Mice ». *Acta Neuropathologica*

*Communications* 7(1):28.

Hernandez, Dena G., Coro Paisán-Ruíz, Aideen McInerney-Leo, Shushant Jain, Andreas Meyer-Lindenberg, E. Whitney Evans, Karen F. Berman, Janel Johnson, Georg Auburger, Alejandro A. Schäffer, Grisel J. Lopez, Robert L. Nussbaum, et Andrew B. Singleton. 2005. « Clinical and Positron Emission Tomography of Parkinson's Disease Caused by *LRRK2*: PD Caused by *LRRK2* ». *Annals of Neurology* 57(3):453-56.

Herzig, Martin C., Michael Bidinosti, Tatjana Schweizer, Thomas Hafner, Christine Stemmelen, Andreas Weiss, Simone Danner, Nella Vidotto, Daniela Stauffer, Carmen Barske, Franziska Mayer, Peter Schmid, Giorgio Rovelli, P. Herman van der Putten, et Derya R. Shimshek. 2012. « High *LRRK2* levels fail to induce or exacerbate neuronal alpha-synucleinopathy in mouse brain. » *PloS one* 7(5).

Herzig, Martin C., Carine Kolly, Elke Persohn, Diethilde Theil, Tatjana Schweizer, Thomas Hafner, Christine Stemmelen, Thomas J. Troxler, Peter Schmid, Simone Danner, Christian R. Schnell, Matthias Mueller, Bernd Kinzel, Armelle Grevot, Federico Bolognani, Martina Stirn, Rainer R. Kuhn, Klemens Kaupmann, P. Herman van der Putten, Giorgio Rovelli, et Derya R. Shimshek. 2011. « *LRRK2* protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice ». *Human Molecular Genetics* 20(21):4209-23.

Higashi, Shinji, Saskia Biskup, Andrew B. West, Daniel Trinkaus, Valina L. Dawson, Richard L. M. Faull, Henry J. Waldvogel, Heii Arai, Ted M. Dawson, Darren J. Moore, et Piers C. Emson. 2007. « Localization of Parkinson's disease-associated *LRRK2* in normal and pathological human brain ». *Brain Research* 1155:208-19.

Higashi, Shinji, Darren J. Moore, Ryoko Yamamoto, Michiko Minegishi, Kiyoshi Sato, Takashi Togo, Omi Katsuse, Hirotake Uchikado, Yoshiko Furukawa, Hiroaki Hino, Kenji Kosaka, Piers C. Emson, Keiji Wada, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, Heii Arai, et Eizo Iseki. 2009. « Abnormal localization of leucine-rich repeat kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in lewy body disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68(9):994–1005.

Ho, Cherry Cheng-Ying, Hardy J. Rideout, Elena Ribe, Carol M. Troy, et William T. Dauer. 2009. « The Parkinson Disease Protein Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Transduces Death Signals via Fas-Associated Protein with Death Domain and Caspase-8 in a Cellular Model of Neurodegeneration ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29(4):1011-16.

Ho, Dong Hwan, A. Reum Je, Haejin Lee, Ilhong Son, Hee-Seok Kweon, Hyung-Gun Kim, et Wongi Seol. 2018. « *LRRK2* Kinase Activity Induces Mitochondrial Fission in Microglia via Drp1 and Modulates Neuroinflammation ». *Experimental Neurobiology* 27(3):171.

Ho, Dong Hwan, Hyejung Kim, Jisun Kim, Hyuna Sim, Hyunjun Ahn, Janghwan Kim, Hyemyung Seo, Kwang Chul Chung, Bum-Joon Park, Ilhong Son, et Wongi Seol. 2015. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (*LRRK2*) phosphorylates p53 and induces p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression ». *Molecular Brain* 8:54.

Hottinger, Andreas F., Mimoun Azzouz, Nicole Déglon, Patrick Aebischer, et Anne D. Zurn. 2000. « Complete and Long-Term Rescue of Lesioned Adult Motoneurons by Lentiviral-Mediated Expression of



Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Facial Nucleus ». *The Journal of Neuroscience* 20(15):5587-93.

Hoyer, Wolfgang, Dmitry Cherny, Vinod Subramaniam, et Thomas M. Jovin. 2004. « Impact of the Acidic C-Terminal Region Comprising Amino Acids 109–140 on  $\alpha$ -Synuclein Aggregation in Vitro ». *Biochemistry* 43(51):16233-42.

Hsieh, Chung-Han, Atossa Shaltouki, Asheley E. Gonzalez, Alexandre Bettencourt da Cruz, Lena F. Burbulla, Erica St Lawrence, Birgitt Schüle, Dimitri Krainc, Theo D. Palmer, et Xinnan Wang. 2016. « Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease ». *Cell Stem Cell* 19(2):804-28.

Huang, Z., Z. Xu, Y. Wu, et Y. Zhou. 2011. « Determining Nuclear Localization of Alpha-Synuclein in Mouse Brains ». *Neuroscience* 199:318-32.

Hunn, Benjamin H. M., Stephanie J. Cragg, J. Paul Bolam, Maria-Grazia Spillantini, et Richard Wade-Martins. 2015. « Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease ». *Trends in Neurosciences* 38(3):178-88.

Hunot, S., N. Dugas, B. Faucheux, A. Hartmann, M. Tardieu, P. Debré, Y. Agid, B. Dugas, et E. C. Hirsch. 1999. « FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(9):3440–7.

Ibáñez, P., A. M. Bonnet, B. Débarges, E. Lohmann, F. Tison, Y. Agid, A. Dürr, A. Brice, et P. Pollak. 2004. « Causal relation between  $\alpha$ -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease ». *The Lancet* 364(9440):1169–1171.

Imamura, Kazuhiro, Nozomi Hishikawa, Makoto Sawada, Toshiharu Nagatsu, Mari Yoshida, et Yoshio Hashizume. 2003. « Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains ». *Acta Neuropathologica* 106(6):518–526.

Iwai, A., E. Masliah, M. Yoshimoto, N. Ge, L. Flanagan, H. A. de Silva, A. Kittel, et T. Saitoh. 1995. « The Precursor Protein of Non-A Beta Component of Alzheimer's Disease Amyloid Is a Presynaptic Protein of the Central Nervous System ». *Neuron* 14(2):467-75.

Jaleel, Mahaboobi, R. Jeremy Nichols, Maria Deak, David G. Campbell, Frank Gillardon, Axel Knebel, et Dario R. Alessi. 2007. « LRRK2 Phosphorylates Moesin at Threonine-558: Characterization of How Parkinson's Disease Mutants Affect Kinase Activity ». *Biochemical Journal* 405(2):307-17.

Janezic, Stephanie, Sarah Threlfell, Paul D. Dodson, Megan J. Dowie, Tonya N. Taylor, Dawid Potgieter, Laura Parkkinen, Steven L. Senior, Sabina Anwar, Brent Ryan, Thierry Deltheil, Polina Kosillo, Milena Cioroch, Katharina Wagner, Olaf Ansorge, David M. Bannerman, J. Paul Bolam, Peter J. Magill, Stephanie J. Cragg, et Richard Wade-Martins. 2013. « Deficits in Dopaminergic Transmission Precede Neuron Loss and Dysfunction in a New Parkinson Model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(42):E4016-4025.

Jarraya, Béchir, Sabrina Boulet, G. Scott Ralph, Caroline Jan, Gilles Bonvento, Mimoun Azzouz, James

E. Miskin, Masahiro Shin, Thierry Delzescaux, Xavier Drouot, Anne-Sophie Hérard, Denise M. Day, Emmanuel Brouillet, Susan M. Kingsman, Philippe Hantraye, Kyriacos A. Mitrophanous, Nicholas D. Mazarakis, et Stéphane Palfi. 2009. « Dopamine Gene Therapy for Parkinson's Disease in a Nonhuman Primate Without Associated Dyskinesia ». *Science Translational Medicine* 1(2):2ra4-2ra4.

Kachergus, Jennifer, Ignacio F. Mata, Mary Hulihan, Julie P. Taylor, Sarah Lincoln, Jan Aasly, J. Mark Gibson, Owen A. Ross, Timothy Lynch, Joseph Wiley, Haydeh Payami, John Nutt, Demetrius M. Maraganore, Krzysztof Czyzewski, Maria Styczynska, Zbigniew K. Wszolek, Matthew J. Farrer, et Mathias Toft. 2005. « Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations ». *American Journal of Human Genetics* 76(4):672–80.

Kalia, Lorraine V., Anthony E. Lang, Lili Naz Hazrati, Shinsuke Fujioka, Zbigniew K. Wszolek, Dennis W. Dickson, Owen A. Ross, Vivianna M. Van Deerlin, John Q. Trojanowski, Howard I. Hurtig, Roy N. Alcalay, Karen S. Marder, Lorraine N. Clark, Carles Gaig, Eduardo Tolosa, Javier Ruiz-Martínez, Jose F. Martí-Masso, Isidre Ferrer, Adolfo López De Munain, Samuel M. Goldman, Birgitt Schüle, J. William Langston, Jan O. Aasly, Maria T. Giordana, Vincenzo Bonifati, Andreas Puschmann, Margherita Canesi, Gianni Pezzoli, Andre Maues De Paula, Kazuko Hasegawa, Charles Duyckaerts, Alexis Brice, A. Jon Stoessl, et Connie Marras. 2015. « Clinical correlations with lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease ». *JAMA Neurology* 72(1):100–105.

Kam, Tae-In, Xiaobo Mao, Hyejin Park, Shih-Ching Chou, Senthilkumar S. Karuppagounder, George Essien Umanah, Seung Pil Yun, Saurav Brahmachari, Nikhil Panicker, Rong Chen, Shaida A. Andrabi, Chen Qi, Guy G. Poirier, Olga Pletnikova, Juan C. Troncoso, Lynn M. Bekris, James B. Leverenz, Alexander Pantelyat, Han Seok Ko, Liana S. Rosenthal, Ted M. Dawson, et Valina L. Dawson. 2018. « Poly(ADP-ribose) drives pathologic a-synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease ». *Science* 362(557).

Kamp, Frits, Nicole Exner, Anne Kathrin Lutz, Nora Wender, Jan Hegermann, Bettina Brunner, Brigitte Nuscher, Tim Bartels, Armin Giese, Klaus Beyer, Stefan Eimer, Konstanze F. Winklhofer, et Christian Haass. 2010. « Inhibition of mitochondrial fusion by  $\alpha$ -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1 ». *The EMBO journal* 29(20):3571-89.

Karuppagounder, Senthilkumar S., Yulan Xiong, Yunjong Lee, Maeve C. Lawless, Donghyun Kim, Emily Nordquist, Ian Martin, Preston Ge, Saurav Brahmachari, Aanishaa Jhaldiyal, Manoj Kumar, Shaida A. Andrabi, Ted M. Dawson, et Valina L. Dawson. 2015. « LRRK2 G2019S transgenic mice display increased susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-mediated neurotoxicity ». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2(2015):4-11.

Kaur, Ramandeep, Sidharth Mehan, et Shamsher Singh. 2019. « Understanding Multifactorial Architecture of Parkinson's Disease: Pathophysiology to Management ». *Neurological Sciences* 40(1):13-23.

Kempster, Peter A., Brian Hurwitz, et Andrew J. Lees. 2007. « A New Look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy ». *Neurology* 69(5):482-85.

Khodr, Christina E., Jyothi Pedapati, Ye Han, et Martha C. Bohn. 2012. « Inclusion of a portion of the native SNCA 3'UTR reduces toxicity of human S129A SNCA on striatal-projecting dopamine neurons in rat

substantia nigra ». *Developmental Neurobiology* 72(6):906-17.

Kim, Beomsue, Myung Soon Yang, Dongjoo Choi, Jong Hyeon Kim, Hye Sun Kim, Wongi Seol, Sangdun Choi, Ilo Jou, Eun Young Kim, et Eun hye Joe. 2012. « Impaired inflammatory responses in murine Irrk2-knockdown brain microglia ». *PLoS ONE* 7(4).

Kim, Sangjune, Seung-Hwan Kwon, Tae-In Kam, Nikhil Panicker, Senthilkumar S. Karuppagounder, Saebom Lee, Jun Hee Lee, Wonjoong Richard Kim, Minjee Kook, Catherine A. Foss, Chentian Shen, Hojae Lee, Subhash Kulkarni, Pankaj J. Pasricha, Gabsang Lee, Martin G. Pomper, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, et Han Seok Ko. 2019. « Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease ». *Neuron*.

Kirik, Deniz, Carl Rosenblad, Corinna Burger, Cecilia Lundberg, Teit E. Johansen, Nicholas Muzyczka, Ronald J. Mandel, et Anders Björklund. 2002. « Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of  $\alpha$ -synuclein in the nigrostriatal system ». *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22(7):2780-91.

Kitada, Tohru, Shuichi Asakawa, Nobutaka Hattori, Hiroto Matsumine, Yasuhiro Yamamura, Shinsei Minoshima, Masayuki Yokochi, Yoshikuni Mizuno, et Nobuyoshi Shimizu. 1998. « Mutations in the Parkin Gene Cause Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism ». *Nature* 392(6676):605-8.

Klivenyi, Peter, Donald Siwek, Gabrielle Gardian, Lichuan Yang, Anatoly Starkov, Carine Cleren, Robert J. Ferrante, Neil W. Kowall, Asa Abeliovich, et M. Flint Beal. 2006. « Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins ». *Neurobiology of Disease* 21(3):541-48.

Kluss, Jillian H., Adamantios Mamais, et Mark R. Cookson. 2019. « LRRK2 Links Genetic and Sporadic Parkinson's Disease ». *Biochemical Society Transactions* 47(2):651-61.

Koch, J. C., F. Bitow, J. Haack, Z. d'Hedouville, J. N. Zhang, L. Tönges, U. Michel, L. M. A. Oliveira, T. M. Jovin, J. Liman, L. Tatenhorst, M. Bähr, et P. Lingor. 2015. « Alpha-Synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons ». *Cell Death & Disease* 6(7):e1811.

Kondo, Kazunari, Saemi Obitsu, et Reiko Teshima. 2011. «  $\alpha$ -Synuclein aggregation and transmission are enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. » *Biological & pharmaceutical bulletin* 34(7):1078-83.

Kordower, Jeffrey H., Yaping Chu, Robert A. Hauser, Thomas B. Freeman, et C. Warren Olanow. 2008. « Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease ». *Nature Medicine* 14(5):504-6.

Krüger, Rejko, Wilfried Kuhn, Thomas Müller, Dirk Voitalla, Manuel Graeber, Sigfried Kösel, Horst Przuntek, Jörg T. Epplen, Ludger Schols, et Olaf Riess. 1998. « AlaSOPro mutation in the gene encoding  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease ». *Nature Genetics* 18(2):106–108.

Lang, Anthony E. et Andres M. Lozano. 1998. « Parkinson's Disease - Firts of Two Parts ». *The New England Journal of Medicine* 1044-53.

Langston, J. W. et P. A. Ballard. 1983. « Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-

phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. » *The New England journal of medicine* 309(5):310.

Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrud, et I. Irwin. 1983. « Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis ». *Science* 219(4587):979-80.

Lee, Byoung Dae, Joo Ho Shin, Jackalina Vankampen, Leonard Petrucelli, Andrew B. West, Han Seok Ko, Yun Il Lee, Kathleen A. Maguire-Zeiss, William J. Bowers, Howard J. Federoff, Valina L. Dawson, et Ted M. Dawson. 2010. « Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease ». *Nature Medicine* 16(9):998-1000.

Lee, He-Jin, Smita Patel, et Seung-Jae Lee. 2005. « Intravesicular Localization and Exocytosis of Alpha-Synuclein and Its Aggregates ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(25):6016-24.

Lee, He-Jin, Ji-Eun Suk, Eun-Jin Bae, Jung-Ho Lee, Seung R. Paik, et Seung-Jae Lee. 2008. « Assembly-Dependent Endocytosis and Clearance of Extracellular  $\alpha$ -Synuclein ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(9):1835-49.

Lee, Jee Hoon, Ji-Hye Han, Hyunmi Kim, Sang Myun Park, Eun-Hye Joe, et Ilo Jou. 2019. « Parkinson's Disease-Associated LRRK2-G2019S Mutant Acts through Regulation of SERCA Activity to Control ER Stress in Astrocytes ». *Acta Neuropathologica Communications* 7(1):68.

Lee, M. K., W. Stirling, Y. Xu, X. Xu, D. Qui, A. S. Mandir, T. M. Dawson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, et D. L. Price. 2002. « Human  $\alpha$ -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53  $\rightarrow$  Thr mutation causes neurodegenerative disease with  $\alpha$ -synuclein aggregation in transgenic mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13):8968-73.

Lees, Andrew J., John Hardy, et Tamas Revesz. 2009. « Parkinson's Disease ». *Lancet (London, England)* 373(9680):2055-66.

Lesage, Suzanne, Mathieu Anheim, Franck Letournel, Luc Bousset, Aurélie Honoré, Nelly Rozas, Laura Pieri, Karine Madiona, Alexandra Dürr, Ronald Melki, Christophe Verny, Alexis Brice, et for the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. 2013. « G51D  $\alpha$ -Synuclein Mutation Causes a Novel Parkinsonian-Pyramidal Syndrome: SNCA G51D in Parkinsonism ». *Annals of Neurology* 73(4):459-71.

Lesage, Suzanne, Laurence Leclere, Ebba Lohmann, Michel Borg, Merle Ruberg, Alexandra Dürr, et Alexis Brice. 2007. « Frequency of the LRRK2 G2019S Mutation in Siblings with Parkinson's Disease ». *Neurodegenerative Diseases* 4(2-3):195-98.

Lesuisse, Christian et Lee J. Martin. 2002. « Immature and Mature Cortical Neurons Engage Different Apoptotic Mechanisms Involving Caspase-3 and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22(8):935-50.

Levine, Paul M., Ana Galesic, Aaron T. Balana, Anne-Laure Mahul-Mellier, Mariana X. Navarro, Cesar A. De Leon, Hilal A. Lashuel, et Matthew R. Pratt. 2019. «  $\alpha$ -Synuclein O-GlcNAcylation Alters Aggregation and Toxicity, Revealing Certain Residues as Potential Inhibitors of Parkinson's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201808845.

- Lewy, F. 1912. « Zur pathologischen anatomie der paralysis agitans. » *Dtsch. Z. Nervenheilkd.*, 50-55.
- Li, Jia-Yi, Elisabet Englund, Janice L. Holton, Denis Soulet, Peter Hagell, Andrew J. Lees, Tammarnyn Lashley, Niall P. Quinn, Stig Rehncrona, Anders Björklund, Håkan Widner, Tamas Revesz, Olle Lindvall, et Patrik Brundin. 2008. « Lewy Bodies in Grafted Neurons in Subjects with Parkinson's Disease Suggest Host-to-Graft Disease Propagation ». *Nature Medicine* 14(5):501-3.
- Li, Wen-Wei, Ru Yang, Jing-Chun Guo, Hui-Min Ren, Xi-Liang Zha, Jie-Shi Cheng, et Ding-Fang Cai. 2007. « Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. » *Neuroreport* 18(15):1543-46.
- Li, Wenxue, Christian Lesuisse, Yanqun Xu, Juan C. Troncoso, Donald L. Price, et Michael K. Lee. 2004. « Stabilization of Alpha-Synuclein Protein with Aging and Familial Parkinson's Disease-Linked A53T Mutation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24(33):7400-7409.
- Li, Wenxue, Neva West, Emanuela Colla, Olga Pletnikova, Juan C. Troncoso, Laura Marsh, Ted M. Dawson, Pekka Jäkälä, Tobias Hartmann, Donald L. Price, et Michael K. Lee. 2005. « Aggregation Promoting C-Terminal Truncation of Alpha-Synuclein Is a Normal Cellular Process and Is Enhanced by the Familial Parkinson's Disease-Linked Mutations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(6):2162-67.
- Li, Xianting, Qing Jun Wang, Nina Pan, Sangkyu Lee, Yingming Zhao, Brian T. Chait, et Zhenyu Yue. 2011. « Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Binding to LRRK2 Is Impaired by Common Mutations of Familial Parkinson's Disease ». *PLoS ONE* 6(3).
- Liao, Jingling et Quyen Q. Hoang. 2018. « Roco Proteins and the Parkinson's Disease-Associated LRRK2 ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(12).
- Liberatore, G. T., V. Jackson-Lewis, S. Vukosavic, a S. Mandir, M. Vila, W. G. McAuliffe, V. L. Dawson, T. M. Dawson, et S. Przedborski. 1999. « Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. » *Nature medicine* 5(12):1403-9.
- Lill, Christina M. 2016. « Genetics of Parkinson's Disease ». *Molecular and Cellular Probes* 30(6):386-96.
- Lin, Xian, Loukia Parisiadou, Xing Long Gu, Lizhen Wang, Hoon Shim, Lixin Sun, Chengsong Xie, Cai Xia Long, Wan Jou Yang, Jinhui Ding, Zsu Zsu Chen, Paul E. Gallant, Jung Hwa Tao-Cheng, Gay Rudow, Juan C. Troncoso, Zhihua Liu, Zheng Li, et Huaibin Cai. 2009. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates the Progression of Neuropathology Induced by Parkinson's-Disease-Related Mutant  $\alpha$ -synuclein ». *Neuron* 64(6):807-27.
- Lindström, Veronica, Gabriel Gustafsson, Laurie H. Sanders, Evan H. Howlett, Jessica Sigvardson, Alex Kasrayan, Martin Ingelsson, Joakim Bergström, et Anna Erlandsson. 2017. « Extensive uptake of  $\alpha$ -synuclein oligomers in astrocytes results in sustained intracellular deposits and mitochondrial damage ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 82:143–156.
- Liu, Guangwei, Chunyan Zhang, Juanjuan Yin, Xin Li, Furong Cheng, Yaohua Li, Hui Yang, Kenji

Uéda, Piu Chan, et Shun Yu. 2009. «  $\alpha$ -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity ». *Neuroscience Letters* 454(3):187-92.

Liu, Zhiyong, Nicole Bryant, Ravindran Kumaran, Alexandra Beilina, Asa Abeliovich, Mark R. Cookson, et Andrew B. West. 2018. « LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network ». *Human Molecular Genetics* 27(2):385-95.

Lobbestael, E., L. Civiero, T. De Wit, J. M. Taymans, E. Greggio, et V. Baekelandt. 2016. « Pharmacological LRRK2 Kinase Inhibition Induces LRRK2 Protein Destabilization and Proteasomal Degradation ». *Scientific Reports* 6:33897.

Lobbestael, Evy, Jing Zhao, Iakov N. Rudenko, Aleksandra Beylina, Fangye Gao, Justin Wetter, Monique Beullens, Mathieu Bollen, Mark R. Cookson, Veerle Baekelandt, R. Jeremy Nichols, et Jean-Marc Taymans. 2013. « Identification of Protein Phosphatase 1 as a Regulator of the LRRK2 Phosphorylation Cycle ». *The Biochemical Journal* 456(1):119-28.

Loeb, Virginie, Eugenia Yakunin, Ann Saada, et Ronit Sharon. 2010. « The transgenic overexpression of ??-synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition ». *Journal of Biological Chemistry* 285(10):7334-43.

Logan, Todd, Jacob Bendor, Chantal Toupin, Kurt Thorn, et Robert H. Edwards. 2017. «  $\alpha$ -Synuclein Promotes Dilation of the Exocytotic Fusion Pore ». *Nature Neuroscience* 20(5):681-89.

Longhena, Francesca, Gaia Faustini, Maria Spillantini, et Arianna Bellucci. 2019. « Living in Promiscuity: The Multiple Partners of Alpha-Synuclein at the Synapse in Physiology and Pathology ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(1):141.

Longo, Francesco, Daniela Mercatelli, Salvatore Novello, Ludovico Arcuri, Alberto Brugnoli, Fabrizio Vincenzi, Isabella Russo, Giulia Berti, Omar S. Mabrouk, Robert T. Kennedy, Derya R. Shimshek, Katia Varani, Luigi Bubacco, Elisa Greggio, et Michele Morari. 2017. « Age-dependent dopamine transporter dysfunction and Serine129 phospho- $\alpha$ -synuclein overload in G2019S LRRK2 mice ». *Acta Neuropathologica Communications* 5(1):22.

Lou, Haiyan, Susana E. Montoya, Tshianda N. M. Alerte, Jian Wang, Jianjun Wu, Xiangmin Peng, Chang-Sook Hong, Emily E. Friedrich, Samantha A. Mader, Courtney J. Pedersen, Brian S. Marcus, Alison L. McCormack, Donato A. Di Monte, S. Colette Daubner, et Ruth G. Perez. 2010. « Serine 129 Phosphorylation Reduces the Ability of  $\alpha$ -Synuclein to Regulate Tyrosine Hydroxylase and Protein Phosphatase 2A in Vitro and in Vivo ». *Journal of Biological Chemistry* 285(23):17648-61.

Luk, Kelvin C., Victoria M. Kehm, Bin Zhang, Patrick O'Brien, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2012. « Intracerebral Inoculation of Pathological  $\alpha$ -Synuclein Initiates a Rapidly Progressive Neurodegenerative  $\alpha$ -Synucleinopathy in Mice ». *Journal of Experimental Medicine* 209(5):975-86.

Luk, Kelvin C., Cheng Song, Patrick O'Brien, Anna Stieber, Jonathan R. Branch, Kurt R. Brunden, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2009. « Exogenous Alpha-Synuclein Fibrils Seed the Formation of

Lewy Body-like Intracellular Inclusions in Cultured Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47):20051-56.

Lunati, A., S. Lesage, et A. Brice. 2018. « The Genetic Landscape of Parkinson's Disease ». *Revue Neurologique* 174(9):628-43.

Lundblad, Martin, Mickael Decressac, Bengt Mattsson, et Anders Björklund. 2012. « Impaired Neurotransmission Caused by Overexpression of  $\alpha$ -Synuclein in Nigral Dopamine Neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(9):3213-19.

Luo, Sarah X. et Eric J. Huang. 2016. « Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly ». *American Journal of Pathology* 186(3):478-88.

Ma, Bo, Leyan Xu, Xiaodong Pan, Lixin Sun, Jinhui Ding, Chengsong Xie, Vassilis E. Koliatsos, et Huaibin Cai. 2015. « LRRK2 modulates microglial activity through regulation of chemokine (C-X3-C) receptor 1 -mediated signalling pathways ». *Human Molecular Genetics* 25(16):3515-23.

Maatouk, Layal, Chenju Yi, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage, Anne-Claire Compagnion, Stéphane Hunot, Pascal Ezan, Etienne C. Hirsch, Annette Koulakoff, Frank W. Pfrieger, François Tronche, Luc Leybaert, Christian Giaume, et Sheela Vyas. 2018. « Glucocorticoid receptor in astrocytes regulates midbrain dopamine neurodegeneration through connexin hemichannel activity ». *Cell Death & Differentiation*.

Machiya, Y., S. Hara, S. Arawaka, S. Fukushima, H. Sato, M. Sakamoto, S. Koyama, et T. Kato. 2010. « Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein at Ser-129 Is Targeted to the Proteasome Pathway in a Ubiquitin-Independent Manner ». *Journal of Biological Chemistry* 285(52):40732-44.

MacLeod, David, Julia Dowman, Rachel Hammond, Thomas Leete, Keiichi Inoue, et Asa Abeliovich. 2006. « The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology ». *Neuron* 52(4):587-93.

Maday, Sandra et Erika L. F. Holzbaur. 2016. « Compartment-Specific Regulation of Autophagy in Primary Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36(22):5933-45.

Mamais, Adamantios, Ruth Chia, Alexandra Beilina, David N. Hauser, Christine Hall, Patrick A. Lewis, Mark R. Cookson, et Rina Bandopadhyay. 2014. « Arsenite stress down-regulates phosphorylation and 14-3-3 binding of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), promoting self-association and cellular redistribution ». *Journal of Biological Chemistry* 289(31):21386-400.

Manfredsson, Fredric P., Kelvin C. Luk, Matthew J. Benskey, Aysegul Gezer, Joanna Garcia, Nathan C. Kuhn, Ivette M. Sandoval, Joseph R. Patterson, Alana O'Mara, Reid Yonkers, et Jeffrey H. Kordower. 2018. « Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology ». *Neurobiology of Disease* 112(October 2017):106-18.

Manzoni, Claudia, Adamantios Mamais, Sybille Dihanich, Rosella Abeti, Marc P. M. Soutar, Helene Plun-Favreau, Paola Giunti, Sharon A. Tooze, Rina Bandopadhyay, et Patrick A. Lewis. 2013. « Inhibition of LRRK2 Kinase Activity Stimulates Macroautophagy ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833(12):2900-2910.

Manzoni, Claudia, Adamantios Mamais, Dorien A. Roosen, Sybille Dihanich, Marc P. M. Soutar, Helene Plun-Favreau, Rina Bandopadhyay, John Hardy, Sharon A. Tooze, Mark R. Cookson, et Patrick A. Lewis. 2016. « MTOR independent regulation of macroautophagy by Leucine Rich Repeat Kinase 2 via Beclin-1 ». *Scientific Reports* 6.

Marcinek, Patrick, Aditya Nath Jha, Vidyagouri Shinde, Arun Sundaramoorthy, Raja Rajkumar, Naveen Chandra Suryadevara, Sanjeev Kumar Neela, Hoang van Tong, Vellingiri Balachander, Vijaya Lakshmi Valluri, Kumarasamy Thangaraj, et Thirumalaisamy P. Velavan. 2013. « LRRK2 and RIPK2 Variants in the NOD 2-Mediated Signaling Pathway Are Associated with Susceptibility to Mycobacterium leprae in Indian Populations ». *PLoS ONE* 8(8).

Maroteaux, L., J. T. Campanelli, et R. H. Scheller. 1988. « Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal ». *Journal of Neuroscience* 8(8):2804-15.

Maroteaux, L. et R. H. Scheller. 1991. « The Rat Brain Synucleins; Family of Proteins Transiently Associated with Neuronal Membrane ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 11(3-4):335-43.

Maroteaux, Luc, James T. Campanelli, et Richard H. Scheller. 1988. « Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal ». *J Neurosci* 8:2804-15.

Marras, Connie, Roy N. Alcalay, Chelsea Caspell-Garcia, Christopher Coffey, Piu Chan, John E. Duda, Maurizio F. Facheris, Rubén Fernández-Santiago, Javier Ruíz-Martínez, Tiago Mestre, Rachel Saunders-Pullman, Claustre Pont-Sunyer, Eduardo Tolosa, Bjorg Waro, et the LRRK2 Cohort Consortium. 2016. « Motor and Nonmotor Heterogeneity of *LRRK2* -related and Idiopathic Parkinson's Disease ». *Movement Disorders* 31(8):1192-1202.

Marrone, Lara, Christine Bus, David Schöndorf, Julia Catherine Fitzgerald, Manuela Kübler, Benjamin Schmid, Peter Reinhardt, Lydia Reinhardt, Michela Deleidi, Tanya Levin, Andrea Meixner, Barbara Klink, Michael Glatza, Christian Johannes Gloeckner, Thomas Gasser, et Jared Sternecker. 2018. « Generation of iPSCs carrying a common LRRK2 risk allele for in vitro modeling of idiopathic Parkinson's disease ». *Plos One* 13(3):e0192497.

Martin, Ian, Jungwoo Wren Kim, Valina L. Dawson, et Ted M. Dawson. 2014. « LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease ». *Journal of Neurochemistry* 131(5):554-65.

Martin, L. J., Y. Pan, A. C. Price, W. Sterling, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. L. Price, et M. K. Lee. 2006. « Parkinson's Disease  $\alpha$ -synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death ». *Journal of Neuroscience* 26(1):41-50.

Martinez, Jimena Hebe, Agustina Alaimo, Roxana Mayra Gorjod, Soledad Porte Alcon, Federico Fuentes, Federico Coluccio Leskow, et Mónica Lidia Kotler. 2018. « Drp-1 dependent mitochondrial fragmentation and protective autophagy in dopaminergic SH-SY5Y cells overexpressing alpha-synuclein ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 88(January):107–117.

Maslah, Eliezer, Edward Rockenstein, Isaac Veinbergs, Margaret Mallory, Makoto Hashimoto, Ayako Takeda, Yutaka Sagara, Abbyann Sisk, et Lennart Mucke. 2000. « Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in  $\alpha$ -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders ». *Science* 287(5456):1265-69.



Matsuda, Wakoto, Takahiro Furuta, Kouichi C. Nakamura, Hiroyuki Hioki, Fumino Fujiyama, Ryohachi Arai, et Takeshi Kaneko. 2009. « Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29(2):444-53.

Matta, Samer, Kristof Van Kolen, Raquel da Cunha, Geert van den Bogaart, Wim Mandemakers, Katarzyna Miskiewicz, Pieter-Jan De Bock, Vanessa A. Morais, Sven Vilain, Dominik Haddad, Lore Delbroek, Jef Swerts, Lucía Chávez-Gutiérrez, Giovanni Esposito, Guy Daneels, Eric Karran, Matthew Holt, Kris Gevaert, Diederik W. Moechars, Bart De Strooper, et Patrik Verstreken. 2012. « LRRK2 Controls an EndoA Phosphorylation Cycle in Synaptic Endocytosis ». *Neuron* 75(6):1008-21.

McGeer, P. L., S. Itagaki, et E. G. McGeer. 1988. « Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease ». *Acta Neuropathologica* 76(6):550–557.

Melki, R. 2018. « Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease ». *Revue Neurologique* 174(9):644-52.

Melki, Ronald. 2015. « Role of different alpha-synuclein strains in synucleinopathies, similarities with other neurodegenerative diseases ». *Journal of Parkinson's Disease* 5(2):217-27.

Melo, T. Q., K. C. van Zomeren, M. F. R. Ferrari, H. W. G. M. Boddeke, et J. C. V. M. Copray. 2016. « Impairment of mitochondria dynamics by human A53T  $\alpha$ -synuclein and rescue by NAP (davunetide) in a cell model for Parkinson's disease ». *Experimental Brain Research*.

Mendez, Ivar, Angel Viñuela, Arnar Astradsson, Karim Mukhida, Penelope Hallett, Harold Robertson, Travis Tierney, Renn Holness, Alain Dagher, John Q. Trojanowski, et Ole Isacson. 2008. « Dopamine Neurons Implanted into People with Parkinson's Disease Survive without Pathology for 14 Years ». *Nature Medicine* 14(5):507-9.

Middleton, Elizabeth R. et Elizabeth Rhoades. 2010. « Effects of Curvature and Composition on  $\alpha$ -Synuclein Binding to Lipid Vesicles ». *Biophysical Journal* 99(7):2279-88.

Miller, D. W., S. M. Hague, J. Clarimon, M. Baptista, K. Gwinn-Hardy, M. R. Cookson, et A. B. Singleton. 2004. « Alpha-Synuclein in Blood and Brain from Familial Parkinson Disease with SNCA Locus Triplication ». *Neurology* 62(10):1835-38.

Mir, Rafeeq, Francesca Tonelli, Pawel Lis, Thomas Macartney, Nicole K. Polinski, Terina N. Martinez, Meng-Yun Chou, Andrew J. M. Howden, Theresa König, Christoph Hotzy, Ivan Milenkovic, Thomas Brücke, Alexander Zimprich, Esther Sammler, et Dario R. Alessi. 2018. « The Parkinson's Disease VPS35[D620N] Mutation Enhances LRRK2-Mediated Rab Protein Phosphorylation in Mouse and Human ». *The Biochemical Journal* 475(11):1861-83.

Mizuno, Yoshikuni, Shigeo Ohta, Masashi Tanaka, Shinzaburo Takamiya, Keiji Suzuki, Takeshi Sato, Hiroshi Oya, Takayuki Ozawa, et Yasuo Kagawa. 1989. « Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 163(3):1450-55.

Moehle, M. S., P. J. Webber, T. Tse, N. Sukar, D. G. Standaert, T. M. DeSilva, R. M. Cowell, et A. B.

West. 2012. « LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses ». *Journal of Neuroscience* 32(5):1602-11.

Mogi, M., M. Harada, P. Riederer, H. Narabayashi, K. Fujita, et T. Nagatsu. 1994. « Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. » *Neuroscience letters* 165(1-2):208-10.

Mogi, Makio, Minoru Harada, Hirotarō Narabayashi, Hirofumi Inagaki, Masayasu Minami, et Toshiharu Nagatsu. 1996. « Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- $\alpha$  levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease ». *Neuroscience Letters* 211(1):13-16.

Mor, Danielle E., Malcolm J. Daniels, et Harry Ischiropoulos. 2019. « The Usual Suspects, Dopamine and Alpha-Synuclein, Conspire to Cause Neurodegeneration: Dopamine and Alpha-Synuclein Collaborate in Disease ». *Movement Disorders* 34(2):167-79.

Mor, Danielle E., Elpida Tsika, Joseph R. Mazzulli, Neal S. Gould, Hanna Kim, Malcolm J. Daniels, Shachee Doshi, Preetika Gupta, Jennifer L. Grossman, Victor X. Tan, Robert G. Kalb, Kim A. Caldwell, Guy A. Caldwell, John H. Wolfe, et Harry Ischiropoulos. 2017. « Dopamine induces soluble  $\alpha$ -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration ». *Nature Neuroscience* 48(11):1560-68.

Mortiboys, Heather, Rebecca Furnston, Gunnar Bronstad, Jan Aasly, Chris Elliott, et Oliver Bandmann. 2015. « UDCA exerts beneficial effect on mitochondrial dysfunction in LRRK2 G2019S carriers and in vivo ». *Neurology* 85(10):846-52.

Mortiboys, Heather, Krisztina K. Johansen, Jan O. Aasly, et Oliver Bandmann. 2010. « Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2 ». *Neurology* 75(22):2017-20.

Mougenot, Anne Laure, Simon Nicot, Anna Bencsik, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Latefa Lakhdar, Stéphane Legastelois, et Thierry Baron. 2012. « Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model ». *Neurobiology of Aging* 33(9):2225-28.

Muda, K., D. Bertinetti, F. Gesellchen, J. S. Hermann, F. von Zweydford, A. Geerlof, A. Jacob, M. Ueffing, C. J. Gloeckner, et F. W. Herberg. 2014. « Parkinson-Related LRRK2 Mutation R1441C/G/H Impairs PKA Phosphorylation of LRRK2 and Disrupts Its Interaction with 14-3-3 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(1):E34-43.

Murphy, D. D., S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee. 2000. « Synucleins Are Developmentally Expressed, and Alpha-Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20(9):3214-20.

Murphy, Michael P. et Richard C. Hartley. 2018. « Mitochondria as a Therapeutic Target for Common Pathologies ». *Nature Reviews Drug Discovery* 17(12):865-86.

Nagatsu, Toshiharu, Akira Nakashima, Hiroshi Ichinose, et Kazuto Kobayashi. 2018. « Human Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease and in Related Disorders ». *Journal of Neural Transmission*.

Nakamura, Ken, Venu M. Nemani, Farnaz Azarbal, Gaia Skibinski, Jon M. Levy, Kiyoshi Egami,

Larissa Munishkina, Jue Zhang, Brooke Gardner, Junko Wakabayashi, Hiromi Sesaki, Yifan Cheng, Steven Finkbeiner, Robert L. Nussbaum, Eliezer Masliah, et Robert H. Edwards. 2011. « Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein  $\alpha$ -synuclein ». *Journal of Biological Chemistry* 286(23):20710-26.

Nakamura, Ken, Venu M. Nemani, Erika K. Wallender, Katrin Kaehlcke, Melanie Ott, et Robert H. Edwards. 2008. « Optical reporters for the conformation of alpha-synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. » *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28(47):12305-17.

Nalls, M. A., N. Pankratz, C. M. Lill, C. B. Do, D. G. Hernandez, M. Saad, A. L. DeStefano, E. Kara, J. Bras, M. Sharma, C. Schulte, M. F. Keller, S. Arepalli, C. Letson, C. Edsall, H. Stefansson, X. Liu, H. Pliner, J. H. Lee, R. Cheng, Consortium International Parkinson's Disease Genomics, GENetics Initiative Parkinson's Study Group Parkinson's Research: The Organized, AndMe, GenePd, Consortium NeuroGenetics Research, Genomics Hussman Institute of Human, Investigator Ashkenazi Jewish Dataset, Health Cohorts for, Epidemiology Aging Research in Genetic, Consortium North American Brain Expression, Consortium United Kingdom Brain Expression, Consortium Greek Parkinson's Disease, Group Alzheimer Genetic Analysis, M. A. Ikram, J. P. Ioannidis, G. M. Hadjigeorgiou, J. C. Bis, M. Martinez, J. S. Perlmutter, A. Goate, K. Marder, B. Fiske, M. Sutherland, G. Xiromerisiou, R. H. Myers, L. N. Clark, K. Stefansson, J. A. Hardy, P. Heutink, H. Chen, N. W. Wood, H. Houlden, H. Payami, A. Brice, W. K. Scott, T. Gasser, L. Bertram, N. Eriksson, T. Foroud, et A. B. Singleton. 2014. « Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease ». *Nat Genet* 46(9):989–993.

Nemani, Venu M., Wei Lu, Victoria Berge, Ken Nakamura, Bibiana Onoa, Michael K. Lee, Farrukh A. Chaudhry, Roger A. Nicoll, et Robert H. Edwards. 2010. « Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis ». *Neuron* 65(1):66-79.

Ng, Chee-Hoe, Shaun Z. S. Mok, Cherlyn Koh, Xuezhi Ouyang, Marc L. Fivaz, Eng-King Tan, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, Fengwei Yu, et Kah-Leong Lim. 2009. « Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in Drosophila. » *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(36):11257-62.

Nichols, R. Jeremy, Nicolas Dzamko, Nicholas A. Morrice, David G. Campbell, Maria Deak, Alban Ordureau, Thomas Macartney, Youren Tong, Jie Shen, Alan R. Prescott, et Dario R. Alessi. 2010. « 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization ». *Biochemical Journal* 430(3):393-404.

Niu, Jingwen, Mei Yu, Chunyan Wang, et Zhiheng Xu. 2012. « Leucine-rich repeat kinase 2 disturbs mitochondrial dynamics via dynamin-like protein ». *Journal of Neurochemistry* 122(3):650-58.

Norris, Erin H., Benoit I. Giasson, Roberto Hodara, Shaohua Xu, John Q. Trojanowski, Harry Ischiropoulos, et Virginia M. Y. Lee. 2005. « Reversible inhibition of  $\alpha$ -synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations ». *Journal of Biological Chemistry* 280(22):21212-19.

Novello, Salvatore, Ludovico Arcuri, Sandra Dovero, Nathalie Dutheil, Derya R. Shimshek, Erwan Bezdard, et Michele Morari. 2018. « G2019S LRRK2 mutation facilitates  $\alpha$ -synuclein neuropathology in aged mice ». *Neurobiology of Disease* 120(June):21-33.

Obergasteiger, Julia, Giulia Frapporti, Giulia Lamonaca, Sara Pizzi, Anne Picard, Franscesca Pischedda, Giovanni Piccoli, Evy Lobbestael, Veerle Baekelandt, Andrew A. Hicks, Corrado Corti, Peter P. Pramstaller, et Mattia Volta. 2019. « Kinase Inhibition of G2019S-LRRK2 Restores Autolysosome Formation and Function to Reduce Endogenous Alpha-Synuclein Intracellular Inclusions ». *BioRxiv* 707273.

Obeso, J. A., M. Stamelou, C. G. Goetz, W. Poewe, A. E. Lang, D. Weintraub, D. Burn, G. M. Halliday, E. Bezdard, S. Przedborski, S. Lehericy, D. J. Brooks, J. C. Rothwell, M. Hallett, M. R. DeLong, C. Marras, C. M. Tanner, G. W. Ross, J. W. Langston, C. Klein, V. Bonifati, J. Jankovic, A. M. Lozano, G. Deuschl, H. Bergman, E. Tolosa, M. Rodriguez-Violante, S. Fahn, R. B. Postuma, D. Berg, K. Marek, D. G. Standaert, D. J. Surmeier, C. W. Olanow, J. H. Kordower, P. Calabresi, A. H. V. Schapira, et A. J. Stoessl. 2017. « Past, Present, and Future of Parkinson's Disease: A Special Essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy ». *Movement disorders* 32(9):1264-1310.

Olanow, C. Warren, Mari Savolainen, Yaping Chu, Glenda M. Halliday, et Jeffrey H. Kordower. 2019. « Temporal Evolution of Microglia and  $\alpha$ -Synuclein Accumulation Following Foetal Grafting in Parkinson's Disease ». *Brain: A Journal of Neurology*.

Orenstein, Samantha J., Sheng-Han Kuo, Inmaculada Tasset, Esperanza Arias, Hiroshi Koga, Irene Fernandez-Carasa, Ety Cortes, Lawrence S. Honig, William Dauer, Antonella Consiglio, Angel Raya, David Sulzer, et Ana Maria Cuervo. 2013. « Interplay of LRRK2 with Chaperone-Mediated Autophagy ». *Nature Neuroscience* 16(4):394-406.

Oueslati, A., B. L. Schneider, P. Aebischer, et H. A. Lashuel. 2013. « Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic  $\alpha$ -synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(41):E3945-54.

Paisán-Ruiz, Coro, Shushant Jain, E. Whitney Evans, William P. Gilks, Javier Simón, Marcel Van Der Brug, Adolfo López De Munain, Silvia Aparicio, Angel Martínez Gil, Naheed Khan, Janel Johnson, Javier Ruiz Martinez, David Nicholl, Itxaso Marti Carrera, Amets Saénz Peña, Rohan De Silva, Andrew Lees, José Félix Martí-Massó, Jordi Pérez-Tur, Nick W. Wood, et Andrew B. Singleton. 2004. « Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease ». *Neuron* 44(4):595-600.

Palfi, Stéphane, Jean Marc Gurruchaga, G. Scott Ralph, Helene Lepetit, Sonia Lavisce, Philip C. Buttery, Colin Watts, James Miskin, Michelle Kelleher, Sarah Deeley, Hirokazu Iwamuro, Jean Pascal Lefaucheur, Claire Thiriez, Gilles Fenelon, Cherry Lucas, Pierre Brugières, Inanna Gabriel, Kou Abhay, Xavier Drouot, Naoki Tani, Aurelie Kas, Bijan Ghaleh, Philippe Le Corvoisier, Patrice Dolphin, David P. Breen, Sarah Mason, Natalie Valle Guzman, Nicholas D. Mazarakis, Pippa A. Radcliffe, Richard Harrop, Susan M. Kingsman, Olivier Rascol, Stuart Naylor, Roger A. Barker, Philippe Hantraye, Philippe Remy, Pierre Cesaro, et Kyriacos A. Mitrophanous. 2014. « Long-Term Safety and Tolerability of ProSavin, a Lentiviral Vector-Based Gene Therapy for Parkinson's Disease: A Dose Escalation, Open-Label, Phase 1/2 Trial ». *The*

*Lancet* 383(9923):1138-46.

Pan, Ping-Yue, Xianting Li, Jing Wang, James Powell, Qian Wang, Yuanxi Zhang, Zhaoyu Chen, Bridget Wicinski, Patrick Hof, Timothy A. Ryan, et Zhenyu Yue. 2017. « Parkinson's disease associated LRRK2 hyperactive kinase mutant disrupts synaptic vesicle trafficking in ventral midbrain neurons ». *The Journal of Neuroscience* 37(47):0964-17.

Papkovskaia, Tatiana D., Kai Yin Chau, Francisco Inesta-vaquera, Dmitri B. Papkovsky, Daniel G. Healy, Koji Nishio, James Staddon, Michael R. Duchon, John Hardy, Anthony H. V. Schapira, et J. Mark Cooper. 2012. « G2019s leucine-rich repeat kinase 2 causes uncoupling protein-mediated mitochondrial depolarization ». *Human Molecular Genetics* 21(19):4201-13.

Parihar, M. S., A. Parihar, M. Fujita, M. Hashimoto, et P. Ghafourifar. 2008. « Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(7-8):1272-84.

Parisiadou, Loukia et Huaibin Cai. 2010. « LRRK2 Function on Actin and Microtubule Dynamics in Parkinson Disease ». *Communicative & Integrative Biology* 3(5):396-400.

Park, Min Jeong, Sang-Myung Cheon, Hye-Ran Bae, Sang-Ho Kim, et Jae Woo Kim. 2011. « Elevated Levels of  $\alpha$ -Synuclein Oligomer in the Cerebrospinal Fluid of Drug-Naïve Patients with Parkinson's Disease ». *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)* 7(4):215-22.

Paxinou, E., Q. Chen, M. Weisse, B. I. Giasson, E. H. Norris, S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, et H. Ischiropoulos. 2001. « Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitritative insult. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(20):8053-61.

Peelaerts, W., L. Bousset, V. Baekelandt, et R. Melki. 2018. «  $\alpha$ -Synuclein Strains and Seeding in Parkinson's Disease, Incidental Lewy Body Disease, Dementia with Lewy Bodies and Multiple System Atrophy: Similarities and Differences ». *Cell and Tissue Research* 373(1):195-212.

Peelaerts, W., L. Bousset, A. Van Der Perren, A. Moskalyuk, R. Pulizzi, M. Giugliano, C. Van Den Haute, R. Melki, et V. Baekelandt. 2015. «  $\alpha$ -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration ». *Nature* 522(7556):340-44.

Peng, Xiangmin, Xiangmin M. Peng, Roya Tehranian, Paula Dietrich, Leonidas Stefanis, et Ruth G. Perez. 2005. « Alpha-Synuclein Activation of Protein Phosphatase 2A Reduces Tyrosine Hydroxylase Phosphorylation in Dopaminergic Cells ». *Journal of Cell Science* 118(Pt 15):3523-30.

Perera, G., M. Ranola, D. B. Rowe, G. M. Halliday, et N. Dzamko. 2016. « Inhibitor Treatment of Peripheral Mononuclear Cells from Parkinson's Disease Patients Further Validates LRRK2 Dephosphorylation as a Pharmacodynamic Biomarker ». *Scientific Reports* 6:31391.

Perez, Ruth G., Jack C. Waymire, Eva Lin, Jen J. Liu, Fengli Guo, et Michael J. Zigmond. 2002. « A Role for Alpha-Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22(8):3090-99.

Pfanner, Nikolaus, Bettina Warscheid, et Nils Wiedemann. 2019. « Mitochondrial Proteins: From Biogenesis to Functional Networks ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(5):267-84.

Pieri, Laura, Karine Madiona, Luc Bousset, et Ronald Melki. 2012. « Fibrillar  $\alpha$ -Synuclein and

Huntingtin Exon 1 Assemblies Are Toxic to the Cells ». *Biophysical Journal* 102(12):2894-2905.

Plowey, Edward D., Jon W. Johnson, Erin Steer, Wan Zhu, David A. Eisenberg, Natalie M. Valentino, Yong-Jian Liu, et Charleen T. Chu. 2014. « Mutant LRRK2 Enhances Glutamatergic Synapse Activity and Evokes Excitotoxic Dendrite Degeneration ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1842(9):1596-1603.

Poewe, Werner, Klaus Seppi, Caroline M. Tanner, Glenda M. Halliday, Patrik Brundin, Jens Volkman, Anette-Eleonore Schrag, et Anthony E. Lang. 2017. « Parkinson Disease ». *Nature Reviews Disease Primers* 3:17013.

Polymeropoulos, Mihael H., Christian Lavedan, Elisabeth Leroy, Susan E. Ide, Anindya Dehejia, Amalia Dutra, Brian Pike, Holly Root, Jeffrey Rubenstein, Rebecca Boyer, Edward S. Stenroos, Settara Chandrasekharappa, Aglaia Athanassiadou, Theodore Papapetropoulos, William G. Johnson, Alice M. Lazzarini, Roger C. Duvoisin, Giuseppe Di Iorio, Lawrence I. Golbe, et Robert L. Nussbaum. 1997. « Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease ». *Science* 276(5321):2045-47.

Pont-Sunyer, Claustre, Eduardo Tolosa, Chelsea Caspell-Garcia, Christopher Coffey, Roy N. Alcalay, Piu Chan, John E. Duda, Maurizio Facheris, Rubén Fernández-Santiago, Kenneth Marek, Francisco Lomeña, Connie Marras, Elisabet Mondragon, Rachel Saunders-Pullman, Bjorg Waro, et on behalf of LRRK2 Cohort Consortium. 2017. « The Prodromal Phase of Leucine-Rich Repeat Kinase 2-Associated Parkinson Disease: Clinical and Imaging Studies: Prodromal Characterization Of *LRRK2* PD ». *Movement Disorders* 32(5):726-38.

Proukakis, Christos, Henry Houlden, et Anthony H. Schapira. 2013. « Somatic Alpha-Synuclein Mutations in Parkinson's Disease: Hypothesis and Preliminary Data ». *Movement Disorders* 28(6):705-12.

Puccini, J. M., D. F. Marker, T. Fitzgerald, J. Barbieri, C. S. Kim, P. Miller-Rhodes, S. M. Lu, S. Dewhurst, et H. A. Gelbard. 2015. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Modulates Neuroinflammation and Neurotoxicity in Models of Human Immunodeficiency Virus 1-Associated Neurocognitive Disorders ». *Journal of Neuroscience* 35(13):5271-83.

van der Putten, H., K. H. Wiederhold, A. Probst, S. Barbieri, C. Mistl, S. Danner, S. Kauffmann, K. Hofele, Wpjm Spooren, M. A. Ruegg, S. Lin, P. Caroni, B. Sommer, M. Tolnay, et G. Bilbe. 2000. « Neuropathology in mice expressing human  $\alpha$ -synuclein ». *Journal of Neuroscience* 20(16):6021-29.

Quiroga-Varela, A., J. R. Walters, E. Brazhnik, C. Marin, et J. A. Obeso. 2013. « What Basal Ganglia Changes Underlie the Parkinsonian State? The Significance of Neuronal Oscillatory Activity ». *Neurobiology of Disease* 58:242-48.

Ramirez, Alfredo, André Heimbach, Jan Gründemann, Barbara Stiller, Dan Hampshire, L. Pablo Cid, Ingrid Goebel, Ammar F. Mubaidin, Abdul-Latif Wriekat, Jochen Roeper, Amir Al-Din, Axel M. Hillmer, Meliha Karsak, Birgit Liss, C. Geoffrey Woods, Maria I. Behrens, et Christian Kubisch. 2006. « Hereditary Parkinsonism with Dementia Is Caused by Mutations in *ATP13A2*, Encoding a Lysosomal Type 5 P-Type ATPase ». *Nature Genetics* 38(10):1184-91.

Reeve, A. K., M. H. R. Ludtmann, P. R. Angelova, E. M. Simcox, M. H. Horrocks, D. Klenerman, S. Gandhi, D. M. Turnbull, et A. Y. Abramov. 2015. « Aggregated  $\alpha$ -synuclein and complex I deficiency:

exploration of their relationship in differentiated neurons. » *Cell death & disease* 6:e1820.

Rich, Peter. 2003. « Chemiosmotic Coupling: The Cost of Living ». *Nature* 421(6923):583.

Rideout, Hardy J. 2017. *Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)*. New York, NY: Springer Science+Business Media.

Robotta, Marta, Julia Cattani, Juliana Cristina Martins, Vinod Subramaniam, et Malte Drescher. 2017. « Alpha-Synuclein disease mutations are structurally defective and locally affect membrane binding ».

Roosen, Dorien A. et Mark R. Cookson. 2016. « LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes ». *Molecular Neurodegeneration* 11:73.

Russo, Isabella, Giulia Berti, Nicoletta Plotegher, Greta Bernardo, Roberta Filograna, Luigi Bubacco, et Elisa Greggio. 2015. « Leucine-rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down-regulates NF- $\kappa$ B p50 signaling in cultured microglia cells ». *Journal of Neuroinflammation* 1-13.

Russo, Isabella, Alice Kaganovich, Jinhui Ding, Natalie Landeck, Adamantios Mamais, Tatiana Varanita, Alice Biosa, Isabella Tessari, Luigi Bubacco, Elisa Greggio, et Mark R. Cookson. 2019. « Transcriptome Analysis of LRRK2 Knock-out Microglia Cells Reveals Alterations of Inflammatory- and Oxidative Stress-Related Pathways upon Treatment with  $\alpha$ -Synuclein Fibrils ». *Neurobiology of Disease* 129:67-78.

Ryan, T., VV. Bamm, MG. Stykel, CL. Coacley, KM. Humphries, R. Jamieson-Williams, R. Ambasadhan, DD. Mosser, SA. Lipton, G. Harauz, et SD. Ryan. 2018. « Cardiolipin exposure on outer mitochondrial membrane modulates a-synuclein ». *Nature Communications* [in press](2018):1–17.

Saez-Atienzar, S., L. Bonet-Ponce, J. R. Blesa, F. J. Romero, M. P. Murphy, J. Jordan, et M. F. Galindo. 2014. « The LRRK2 inhibitor GSK2578215A induces protective autophagy in SH-SY5Y cells: involvement of Drp-1-mediated mitochondrial fission and mitochondrial-derived ROS signaling. » *Cell death & disease* 5(8):e1368.

Saha, Shamol, Peter E. a. Ash, Vivek Gowda, Liqun Liu, Orian Shirihai, et Benjamin Wolozin. 2015. « Mutations in LRRK2 potentiate age-related impairment of autophagic flux ». *Molecular Neurodegeneration* 10(1):26.

Saha, Shamol, Maria D. Guillily, Andrew Ferree, Joel Lanceta, Diane Chan, Joy Ghosh, Cindy H. Hsu, Lilach Segal, Kesav Raghavan, Kunihiro Matsumoto, Naoki Hisamoto, Tomoki Kuwahara, Takeshi Iwatsubo, Landon Moore, Lee Goldstein, Mark Cookson, et Benjamin Wolozin. 2009. « LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(29):9210-18.

Samaranch, Lluís, Oswaldo Lorenzo-Betancor, José M. Arbelo, Isidre Ferrer, Elena Lorenzo, Jaione Irigoyen, Maria A. Pastor, Carmen Marrero, Concepción Isla, Joanna Herrera-Henriquez, et Pau Pastor. 2010. « PINK1-Linked Parkinsonism Is Associated with Lewy Body Pathology ». *Brain: A Journal of Neurology* 133(Pt 4):1128-42.

Sanders, William R. 1865. « Case of an Unusual Form of Nervous Disease, Dystaxia or Pseudo-Paralysis Agitans, with Remarks ». *Edinburgh Medical Journal* 10(11):987-97.

Sarafian, Theodore A., Christopher M. Ryan, Puneet Souda, Eliezer Masliah, Upendra K. Kar, Harry V. Vinters, Gary W. Mathern, Kym F. Faull, Julian P. Whitelegge, et Joseph B. Watson. 2013. « Impairment of Mitochondria in Adult Mouse Brain Overexpressing Predominantly Full-Length, N-Terminally Acetylated Human alpha-Synuclein ». *PLoS ONE* 8(5).

Satake, Wataru, Yuko Nakabayashi, Ikuko Mizuta, Yushi Hirota, Chiyomi Ito, Michiaki Kubo, Takahisa Kawaguchi, Tatsuhiko Tsunoda, Masahiko Watanabe, Atsushi Takeda, Hiroyuki Tomiyama, Kenji Nakashima, Kazuko Hasegawa, Fumiya Obata, Takeo Yoshikawa, Hideshi Kawakami, Saburo Sakoda, Mitsutoshi Yamamoto, Nobutaka Hattori, Miho Murata, Yusuke Nakamura, et Tatsushi Toda. 2009. « Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease ». *Nature Genetics* 41(12):1303-7.

Sato, H., S. Arawaka, S. Hara, S. Fukushima, K. Koga, S. Koyama, et T. Kato. 2011. « Authentically Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein at Ser129 Accelerates Neurodegeneration in a Rat Model of Familial Parkinson's Disease ». *Journal of Neuroscience* 31(46):16884-94.

Schapansky, Jason, Saurabh Khasnavis, Mark P. DeAndrade, Jonathan D. Nardozi, Samuel R. Falkson, Justin D. Boyd, John B. Sanderson, Tim Bartels, Heather L. Melrose, et Matthew J. LaVoie. 2018. « Familial knockin mutation of LRRK2 causes lysosomal dysfunction and accumulation of endogenous insoluble  $\alpha$ -synuclein in neurons. » *Neurobiology of disease* 111(August 2017):26–35.

Schapansky, Jason, Jonathan D. Nardozi, Fredrik Felizia, et Matthew J. LaVoie. 2014. « Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy ». *Human Molecular Genetics* 23(16):4201-14.

Schapira, A. H. 1993. « Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease ». *Advances in Neurology* 60:288-91.

Schapira, a H., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner, et C. D. Marsden. 1990. « Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. » *Journal of neurochemistry* 54(3):823-27.

Schapira, Anthony HV. 2008. « Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease ». *The Lancet Neurology* 7(1):97-109.

Schmidt, Sven H., Matthias J. Knape, Daniela Boassa, Natascha Mumdey, Alexandr P. Kornev, Mark H. Ellisman, Susan S. Taylor, et Friedrich W. Herberg. 2019. « The Dynamic Switch Mechanism That Leads to Activation of LRRK2 Is Embedded in the DFG $\psi$  Motif in the Kinase Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(30):14979-88.

Schneider, Jaime L. et Ana Maria Cuervo. 2014. « Autophagy and Human Disease: Emerging Themes ». *Current Opinion in Genetics & Development* 26:16-23.

Schneider, Susanne A. et Roy N. Alcalay. 2017. « Neuropathology of Genetic Synucleinopathies with Parkinsonism: Review of the Literature: Neuropathology of Genetic Parkinson's Disease ». *Movement Disorders* 32(11):1504-23.

Segura-Aguilar, Juan, Irmgard Paris, Patricia Muñoz, Emanuele Ferrari, Luigi Zecca, et Fabio A. Zucca. 2014. « Protective and Toxic Roles of Dopamine in Parkinson's Disease ». *Journal of Neurochemistry*



129(6):898-915.

Senior, Steven L., Natalia Ninkina, Robert Deacon, David Bannerman, Vladimir L. Buchman, Stephanie J. Cragg, et Richard Wade-Martins. 2008. « Increased Striatal Dopamine Release and Hyperdopaminergic-like Behaviour in Mice Lacking Both Alpha-Synuclein and Gamma-Synuclein ». *The European Journal of Neuroscience* 27(4):947-57.

Seol, Wongi, Daleum Nam, et Ilhong Son. 2019. « Rab GTPases as Physiological Substrates of LRRK2 Kinase ». *Experimental Neurobiology* 28(2):134-45.

Shahmoradian, Sarah H., Amanda J. Lewis, Christel Genoud, Jürgen Hench, Tim E. Moors, Paula P. Navarro, Daniel Castaño-Diez, Gabriel Schweighauser, Alexandra Graff-Meyer, Kenneth N. Goldie, Rosmarie Sütterlin, Evelien Huisman, Angela Ingrassia, Yvonne de Gier, Annemieke J. M. Rozemuller, Jing Wang, Anne De Paepe, Johannes Erny, Andreas Staempfli, Joerg Hoernschemeyer, Frederik Großrüschkamp, Daniel Niedieker, Samir F. El-Mashtoly, Marialuisa Quadri, Wilfred F. J. Van IJcken, Vincenzo Bonifati, Klaus Gerwert, Bernd Bohrmann, Stephan Frank, Markus Britschgi, Henning Stahlberg, Wilma D. J. Van de Berg, et Matthias E. Lauer. 2019. « Lewy Pathology in Parkinson's Disease Consists of Crowded Organelles and Lipid Membranes ». *Nature Neuroscience* 22(7):1099-1109.

Sharon, Ronit, Ifat Bar-Joseph, Matthew P. Frosch, Dominic M. Walsh, James A. Hamilton, et Dennis J. Selkoe. 2003. « The Formation of Highly Soluble Oligomers of Alpha-Synuclein Is Regulated by Fatty Acids and Enhanced in Parkinson's Disease ». *Neuron* 37(4):583-95.

Sheng, Z., S. Zhang, D. Bustos, T. Kleinheinz, C. E. Le Pichon, S. L. Dominguez, H. O. Solanoy, J. Drummond, X. Zhang, X. Ding, F. Cai, Q. Song, X. Li, Z. Yue, M. P. van der Brug, D. J. Burdick, J. Gunzner-Toste, H. Chen, X. Liu, A. A. Estrada, Z. K. Sweeney, K. Scearce-Levie, J. G. Moffat, D. S. Kirkpatrick, et H. Zhu. 2012. « Ser1292 Autophosphorylation Is an Indicator of LRRK2 Kinase Activity and Contributes to the Cellular Effects of PD Mutations ». *Science Translational Medicine* 4(164):164ra161–164ra161.

Shin, Narae, Hyerhan Jeong, Jungsun Kwon, Hye Young Heo, Jung June Kwon, Hye Jin Yun, Cy-Hyun Kim, Baek Soo Han, Youren Tong, Jie Shen, Taku Hatano, Nobutaka Hattori, Kwang-Soo Kim, Sunghoe Chang, et Wongi Seol. 2008. « LRRK2 Regulates Synaptic Vesicle Endocytosis ». *Experimental Cell Research* 314(10):2055-65.

da Silveira, Samareh Azeredo, Bernard L. Schneider, Carmen Cifuentes-Diaz, Daniel Sage, Toufik Abbas-Terki, Takeshi Iwatsubo, Michaël Unser, et Patrick Aebischer. 2009. « Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of  $\alpha$ -synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease ». *Human Molecular Genetics* 18(5):872-87.

Simón-Sánchez, Javier, Claudia Schulte, Jose M. Bras, Manu Sharma, J. Raphael Gibbs, Daniela Berg, Coro Paisan-Ruiz, Peter Lichtner, Sonja W. Scholz, Dena G. Hernandez, Rejko Krüger, Monica Federoff, Christine Klein, Alison Goate, Joel Perlmutter, Michael Bonin, Michael A. Nalls, Thomas Illig, Christian Gieger, Henry Houlden, Michael Steffens, Michael S. Okun, Brad A. Racette, Mark R. Cookson, Kelly D. Foote, Hubert H. Fernandez, Bryan J. Traynor, Stefan Schreiber, Sampath Arepalli, Ryan Zonozi, Katrina Gwinn, Marcel Van Der Brug, Grisel Lopez, Stephen J. Chanock, Arthur Schatzkin, Yikyung Park, Albert

Hollenbeck, Jianjun Gao, Xuemei Huang, Nick W. Wood, Delia Lorenz, Günther Deuschl, Honglei Chen, Olaf Riess, John A. Hardy, Andrew B. Singleton, et Thomas Gasser. 2009. « Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease ». *Nature Genetics* 41(12):1308-12.

Singer, T. P. et R. R. Ramsay. 1990. « Mechanism of the Neurotoxicity of MPTP. An Update ». *FEBS Letters* 274(1-2):1-8.

Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M. R. Cookson, M. Muentert, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy, et K. Gwinn-Hardy. 2003. «  $\alpha$ -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease ». *Science* 302(5646):841.

Singleton, Andrew B. 2005. « Altered Alpha-Synuclein Homeostasis Causing Parkinson's Disease: The Potential Roles of Dardarin ». *Trends in Neurosciences* 28(8):416-21.

Singleton, Andrew B., Matthew J. Farrer, et Vincenzo Bonifati. 2013. « The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications ». *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28(1):14-23.

Skaper, Stephen D., Laura Facci, Morena Zusso, et Pietro Giusti. 2018. « An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12(March):1-26.

Skibinski, Gaia, Ken Nakamura, Mark R. Cookson, et Steven Finkbeiner. 2014. « Mutant LRRK2 toxicity in neurons depends on LRRK2 levels and synuclein but not kinase activity or inclusion bodies. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(2):418-33.

Smith, W. W., Z. Pei, H. Jiang, V. L. Dawson, T. M. Dawson, et C. A. Ross. 2006. « Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity ». *Nature neuroscience* 9(10):1231-33.

Smith, Wanli W., Russell L. Margolis, Xiaojie Li, Juan C. Troncoso, Michael K. Lee, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, Takashi Iwatsubo, et Christopher A. Ross. 2005. « Alpha-Synuclein Phosphorylation Enhances Eosinophilic Cytoplasmic Inclusion Formation in SH-SY5Y Cells ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(23):5544-52.

Smith, Wanli W., Zhong Pei, Haibing Jiang, Darren J. Moore, Yideng Liang, Andrew B. West, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, et Christopher A. Ross. 2005. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Interacts with Parkin, and Mutant LRRK2 Induces Neuronal Degeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(51):18676-81.

Song, David D., Clifford W. Shults, Abbyann Sisk, Edward Rockenstein, et Eliezer Masliah. 2004. « Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice after treatment with MPTP ». *Experimental Neurology* 186(2):158-72.

Souza, J. M., B. I. Giasson, V. M. Lee, et H. Ischiropoulos. 2000. « Chaperone-like Activity of Synucleins ». *FEBS Letters* 474(1):116-19.

Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, et M. Goedert. 1998. « Alpha-Synuclein in Filamentous Inclusions of Lewy Bodies from Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11):6469-73.

Spillantini, Maria Grazia et Michel Goedert. 2018. « Neurodegeneration and the Ordered Assembly of  $\alpha$ -Synuclein ». *Cell and Tissue Research* 373(1):137-48.

Spillantini, Maria Grazia, Marie Luise Schmidt, Virginia M. Y. Lee, John Q. Trojanowski, Ross Jakes, et Michel Goedert. 1997. «  $\alpha$ -Synuclein in Lewy Bodies ». *Nature* 388(6645):839-40.

Steger, Martin, Federico Diez, Herschel S. Dhekne, Pawel Lis, Raja S. Nirujogi, Ozge Karayel, Francesca Tonelli, Terina N. Martinez, Esben Lorentzen, Suzanne R. Pfeffer, Dario R. Alessi, et Matthias Mann. 2017. « Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis ». *eLife* 6.

Steger, Martin, Francesca Tonelli, Genta Ito, Paul Davies, Matthias Trost, Melanie Vetter, Stefanie Wachter, Esben Lorentzen, Graham Duddy, Stephen Wilson, Marco A. S. Baptista, Brian K. Fiske, Matthew J. Fell, John A. Morrow, Alastair D. Reith, Dario R. Alessi, et Matthias Mann. 2016. « Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases ». *eLife* 5(JANUARY2016):1-28.

Stichel, Christine C., Xin Ran Zhu, Verian Bader, Bettina Linnartz, Saskia Schmidt, et Hermann Lübbert. 2007. « Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage ». *Human Molecular Genetics* 16(20):2377-93.

Su, Yu Chin, Xing Guo, et Xin Qi. 2015. « Threonine 56 phosphorylation of Bcl-2 is required for LRRK2 G2019S-induced mitochondrial depolarization and autophagy ». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1852(1):12-21.

Su, Yu Chin et Xin Qi. 2013. « Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation ». *Human Molecular Genetics* 22(22):4545-61.

Su, Yu-Chin et Xin Qi. 2013. « Inhibition of Excessive Mitochondrial Fission Reduced Aberrant Autophagy and Neuronal Damage Caused by LRRK2 G2019S Mutation ». *Human Molecular Genetics* 22(22):4545-61.

Subramaniam, Sudhakar Raja, Laurent Vergnes, Nicholas R. Franich, Karen Reue, et Marie Françoise Chesselet. 2014. « Region specific mitochondrial impairment in mice with widespread overexpression of alpha-synuclein ». *Neurobiology of Disease* 70:204-13.

Surmeier, D. James, Jun Ding, Michelle Day, Zhongfeng Wang, et Weixing Shen. 2007. « D1 and D2 Dopamine-Receptor Modulation of Striatal Glutamatergic Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons ». *Trends in Neurosciences* 30(5):228-35.

Surmeier, D. James, José A. Obeso, et Glenda M. Halliday. 2017. « Parkinson's Disease Is Not Simply a Prion Disorder ». *The Journal of Neuroscience* 37(41):9799–9807.

Tabrez, Shams, Nasimudeen R. Jabir, Shazi Shakil, Nigel H. Greig, Qamre Alam, Adel M. Abuzenadah, Ghazi A. Damanhour, et Mohammad A. Kamal. 2012. « A Synopsis on the Role of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease ». *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 11(4):395-409.

Tagliaferro, Patricia et Robert E. Burke. 2016. « Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease ». *Journal of Parkinson's Disease* 6(1):1-15.

Taipa, Ricardo, Conceição Pereira, Inês Reis, Isabel Alonso, António Bastos-Lima, Manuel Melo-Pires, et Marina Magalhães. 2016. « DJ-1 Linked Parkinsonism (PARK7) Is Associated with Lewy Body Pathology ». *Brain: A Journal of Neurology* 139(Pt 6):1680-87.

Tanaka, Atsushi, Megan M. Cleland, Shan Xu, Derek P. Narendra, Der-Fen Suen, Mariusz Karbowski, et Richard J. Youle. 2010. « Proteasome and P97 Mediate Mitophagy and Degradation of Mitofusins Induced by Parkin ». *The Journal of Cell Biology* 191(7):1367-80.

Tanner, Caroline M., Freya Kamel, G. Webster Ross, Jane A. Hoppin, Samuel M. Goldman, Monica Korell, Connie Marras, Grace S. Bhudhikanok, Meike Kasten, Anabel R. Chade, Kathleen Comyns, Marie Barber Richards, Cheryl Meng, Benjamin Priestley, Hubert H. Fernandez, Franca Cambi, David M. Umbach, Aaron Blair, Dale P. Sandler, et J. William Langston. 2011. « Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease ». *Environmental Health Perspectives* 119(6):866-72.

Tarasova, Tatiana V., Olga A. Lytkina, Valeria V. Goloborshcheva, Larisa N. Skuratovskaya, Alexandr I. Antohin, Ruslan K. Ovchinnikov, et Michail S. Kukharsky. 2018. « Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra , but not the ventral tegmental area , in mouse brain ».

Taymans, Jean-Marc et Elisa Greggio. 2016. « LRRK2 Kinase Inhibition as a Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease, Where Do We Stand? » *Current neuropharmacology* 14(3):214–25.

Taymans, Jean-Marc, Renée Vancraenenbroeck, Petri Ollikainen, Alexandra Beilina, Evy Lobbestael, Marc De Maeyer, Veerle Baekelandt, et Mark R. Cookson. 2011. « LRRK2 Kinase Activity Is Dependent on LRRK2 GTP Binding Capacity but Independent of LRRK2 GTP Binding ». *PLoS ONE* 6(8).

Tong, Youren, Hiroo Yamaguchi, Emilie Giaime, Scott Boyle, Raphael Kopan, Raymond J. Kelleher, et Jie Shen. 2010. « Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(21):9879-84.

Trétiakoff, C. D. 1919. « Contribution à L'étude De L'anatomie Pathologique Du Locus Niger De Soemmering Avec Quelques Deductions Relatives A La Pathogenie Des Troubles Du Tonus Musculaire Et De La Maladie De Parkinson. » *Paris: Universtié de Paris*.

Trexler, Adam J. et Elizabeth Rhoades. 2012. « N-Terminal Acetylation Is Critical for Forming  $\alpha$ -Helical Oligomer of  $\alpha$ -Synuclein ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 21(5):601-5.

Tsika, Elpida, Maria Moysidou, Jing Guo, Mimi Cushman, Patrick Gannon, Raphael Sandaltzopoulos, Benoit I. Giasson, Dimitri Krainc, Harry Ischiropoulos, et Joseph R. Mazzulli. 2010. « Distinct Region-Specific Alpha-Synuclein Oligomers in A53T Transgenic Mice: Implications for Neurodegeneration ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(9):3409-18.

Ulusoy, Ayse, Ruth E. Musgrove, Raffaella Rusconi, Michael Klinkenberg, Michael Helwig, Anja Schneider, et Donato A. Di Monte. 2015. « Neuron-to-neuron  $\alpha$ -synuclein propagation in vivo is independent of neuronal injury ». *Acta Neuropathologica Communications* 3(1):13.

Valente, E. M. 2004. « Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1 ».

*Science* 304(5674):1158-60.

Van Den Berge, Nathalie, Nelson Ferreira, Hjalte Gram, Trine Werenberg Mikkelsen, Aage Kristian Olsen Alstrup, Nicolas Casadei, Pai Tsung-Pin, Olaf Riess, Jens Randel Nyengaard, Gültekin Tamgüney, Poul Henning Jensen, et Per Borghammer. 2019. « Evidence for Bidirectional and Trans-Synaptic Parasympathetic and Sympathetic Propagation of Alpha-Synuclein in Rats ». *Acta Neuropathologica*.

Vancraenenbroeck, Renée, Joren De Raeymaecker, Evy Lobbstaël, Fangye Gao, Marc De Maeyer, Arnout Voet, Veerle Baekelandt, et Jean-Marc Taymans. 2014. « In silico, in vitro and cellular analysis with a kinome-wide inhibitor panel correlates cellular LRRK2 dephosphorylation to inhibitor activity on LRRK2 ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:51.

Vargas, Jessica Y., Clara Grudina, et Chiara Zurzolo. 2019. « The Prion-like Spreading of  $\alpha$ -Synuclein: From in Vitro to in Vivo Models of Parkinson's Disease ». *Ageing Research Reviews* 50:89-101.

Vargas, Karina J., Sachin Makani, Taylor Davis, Christopher H. Westphal, Pablo E. Castillo, et Sreeganga S. Chandra. 2014. « Synucleins Regulate the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34(28):9364-76.

Volpicelli-Daley, L. A., H. Abdelmotilib, Z. Liu, L. Stoyka, J. P. L. Daher, A. J. Milnerwood, V. K. Unni, W. D. Hirst, Z. Yue, H. T. Zhao, K. Fraser, R. E. Kennedy, et A. B. West. 2016. « G2019S-LRRK2 Expression Augments  $\alpha$ -Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons ». *Journal of Neuroscience* 36(28):7415-27.

Volpicelli-Daley, Laura A., Deniz Kirik, Lindsay E. Stoyka, David G. Standaert, et Ashley S. Harms. 2016. « How Can RAAV- $\alpha$ -Synuclein and the Fibril  $\alpha$ -Synuclein Models Advance Our Understanding of Parkinson's Disease? » *Journal of Neurochemistry* 139:131-55.

Volpicelli-Daley, Laura A., Kelvin C. Luk, Tapan P. Patel, Selcuk A. Tanik, Dawn M. Riddle, Anna Stieber, David F. Meaney, John Q. Trojanowski, et Virginia M. Y. Lee. 2011. « Exogenous  $\alpha$ -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death ». *Neuron* 72(1):57-71.

Volpicelli-daley, X. Laura A., X. Hisham Abdelmotilib, Zhiyong Liu, Lindsay Stoyka, Lima Daher, X. Austen J. Milnerwood, Vivek K. Unni, Warren D. Hirst, Zhenyu Yue, Hien T. Zhao, Xkyle Fraser, X. Richard E. Kennedy, et Andrew B. West. 2016. « G2019S-LRRK2 Expression Augments Alpha-Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons ». *Neurobiology of Disease* 36(28):7415-27.

Volta, Mattia et Heather Melrose. 2017. « LRRK2 Mouse Models: Dissecting the Behavior, Striatal Neurochemistry and Neurophysiology of PD Pathogenesis ». *Biochemical Society Transactions* 45(1):113-22.

Wakabayashi, K., S. Hayashi, M. Yoshimoto, H. Kudo, et H. Takahashi. 2000. « NACP/ $\alpha$ -Synuclein-Positive Filamentous Inclusions in Astrocytes and Oligodendrocytes of Parkinson's Disease Brains ». *Acta Neuropathologica* 99(1):14-20.

Walker, Matthew D., Mattia Volta, Stefano Cataldi, Katherine Dinelle, Dayne Beccano-Kelly, Lise Munsie, Rick Kornelsen, Chenoa Mah, Patrick Chou, Kimberley Co, Jaskaran Khinda, Marta Mroczek, Sabrina Bergeron, Katrina Yu, Li P. ing Cao, Natalja Funk, Thomas Ott, Dagmar Galter, Olaf Riess, Saskia Biskup, Austen J. Milnerwood, A. Jon Stoessl, Matthew J. Farrer, et Vesna Sossi. 2014. « Behavioral deficits

and striatal DA signaling in LRRK2 p.G2019S transgenic rats: a multimodal investigation including PET neuroimaging ». *Journal of Parkinson's disease* 4(3):483-98.

Wang, D., L. Xu, L. Lv, L. Y. Su, Y. Fan, D. F. Zhang, R. Bi, D. Yu, W. Zhang, X. A. Li, Y. Y. Li, et Y. G. Yao. 2015. « Association of the LRRK2 genetic polymorphisms with leprosy in Han Chinese from Southwest China ». *Genes and Immunity* 16(2):112-19.

Wang, Xinglong, Michael H. Yan, Hisashi Fujioka, Jun Liu, Amy Wilson-delfosse, Shu G. Chen, George Perry, Gemma Casadesus, et Xiongwei Zhu. 2012. « LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1 ». *Human Molecular Genetics* 21(9):1931-44.

Wang, Xinhe, Katelyn Becker, Nathan Levine, Michelle Zhang, Andrew P. Lieberman, Darren J. Moore, et Jiyang Ma. 2019. « Pathogenic Alpha-Synuclein Aggregates Preferentially Bind to Mitochondria and Affect Cellular Respiration ». *Acta Neuropathologica Communications* 7(1):41.

Wauters, Fieke, Tom Cornelissen, Dorien Imberechts, Shaun Martin, Brianada Koentjoro, Carolyn Sue, Peter Vangheluwe, et Wim Vandenberghe. 2019. « LRRK2 mutations impair depolarization-induced mitophagy through inhibition of mitochondrial accumulation of RAB10 ». *Autophagy* 0(0):1-20.

Webb, Julie L., Brinda Ravikumar, Jane Atkins, Jeremy N. Skepper, et David C. Rubinsztein. 2003. «  $\alpha$ -synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome ». *Journal of Biological Chemistry* 278(27):25009–25013.

West, Andrew B. 2017. « Achieving neuroprotection with LRRK2 kinase inhibitors in Parkinson disease ». *Experimental Neurology* 298(May):236–245.

West, Andrew B., Rita M. Cowell, João P. L. Daher, Mark S. Moehle, Kelly M. Hinkle, Heather L. Melrose, David G. Standaert, et Laura A. Volpicelli-Daley. 2014a. « Differential LRRK2 Expression in the Cortex, Striatum, and Substantia Nigra in Transgenic and Nontransgenic Rodents ». *The Journal of comparative neurology* 522(11):2465-80.

West, Andrew B., Rita M. Cowell, João P. L. Daher, Mark S. Moehle, Kelly M. Hinkle, Heather L. Melrose, David G. Standaert, et Laura A. Volpicelli-Daley. 2014b. « Differential LRRK2 Expression in the Cortex, Striatum, and Substantia Nigra in Transgenic and Nontransgenic Rodents ». *The Journal of comparative neurology* 522(11):2465-80.

West, Andrew B., Darren J. Moore, Saskia Biskup, Artem Bugayenko, Wanli W. Smith, Christopher a Ross, Valina L. Dawson, et Ted M. Dawson. 2005. « Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(46):16842-47.

West, Andrew B., Darren J. Moore, Catherine Choi, Shaida A. Andrabi, Xiaojie Li, Dustin Dikeman, Saskia Biskup, Zhenshui Zhang, Kah Leong Lim, Valina L. Dawson, et Ted M. Dawson. 2007. « Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity ». *Human Molecular Genetics* 16(2):223-32.

Winner, B., R. Jappelli, S. K. Maji, P. A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F. H. Gage,

et R. Riek. 2011. « In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(10):4194-99.

Wong, Yvette C. et Dimitri Krainc. 2017. «  $\alpha$ -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies ». *Nature Medicine* 23(2):1-13.

Wu, D. C., Vernice Jackson-Lewis, Miquel Vila, Kim Tieu, Peter Teismann, Caryn Vadseth, Dong-Kug Choi, Harry Ischiropoulos, et Serge Przedborski. 2002. « Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(5):1763-71.

Xie, Weilin et Kenny K. K. Chung. 2012. « Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease ». *Journal of Neurochemistry* 122(2):404-14.

Xiong, Yulan, Stewart Neifert, Senthilkumar S. Karuppagounder, Qinfang Liu, Jeannette N. Stankowski, Byoung Dae Lee, Han Seok Ko, Yunjong Lee, Jonathan C. Grima, Xiaobo Mao, Haisong Jiang, Sung-Ung Kang, Deborah A. Swing, Lorraine Iacovitti, Lino Tessarollo, Ted M. Dawson, et Valina L. Dawson. 2018. « Robust kinase- and age-dependent dopaminergic and norepinephrine neurodegeneration in LRRK2 G2019S transgenic mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(7):201712648.

Xiong, Yulan, Stewart Neifert, Senthilkumar S. Karuppagounder, Jeannette N. Stankowski, Byoung Dae Lee, Jonathan C. Grima, Guanxing Chen, Han Seok Ko, Yunjong Lee, Debbie Swing, Lino Tessarollo, Ted M. Dawson, et Valina L. Dawson. 2017. « Overexpression of Parkinson's Disease-Associated Mutation LRRK2 G2019S in Mouse Forebrain Induces Behavioral Deficits and  $\alpha$ -Synuclein Pathology. » *eNeuro* 4(2):1-10.

Youdim, Moussa B. H., Dale Edmondson, et Keith F. Tipton. 2006. « The Therapeutic Potential of Monoamine Oxidase Inhibitors ». *Nature Reviews Neuroscience* 7(4):295-309.

Yue, M., K. M. Hinkle, P. Davies, E. Trushina, F. C. Fiesel, T. A. Christenson, A. S. Schroeder, L. Zhang, E. Bowles, B. Behrouz, S. J. Lincoln, J. E. Bevers, A. J. Milnerwood, A. Kurti, P. J. McLean, J. D. Fryer, W. Springer, D. W. Dickson, M. J. Farrer, et H. L. Melrose. 2015. « Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice ». *Neurobiology of Disease* 78:172-95.

Yun, Hye Jin, Joohyun Park, Dong Hwan Ho, Heyjung Kim, Cy-Hyun Kim, Hakjin Oh, Inhwa Ga, Hyemyung Seo, Sunghoe Chang, Ilhong Son, et Wongi Seol. 2013. « LRRK2 Phosphorylates Snapin and Inhibits Interaction of Snapin with SNAP-25 ». *Experimental & Molecular Medicine* 45(8):e36-e36.

Yun, Seung Pil, Tae-in Kam, Nikhil Panicker, Sangmin Kim, Yumin Oh, Jong-sung Park, Seung-hwan Kwon, Yong Joo Park, Senthilkumar S. Karuppagounder, Hyejin Park, Sangjune Kim, Nayeon Oh, Nayoung Alice Kim, Saebom Lee, Saurav Brahmachari, Xiaobo Mao, Jun Hee Lee, Manoj Kumar, Daniel An, Sung-ung Kang, Yunjong Lee, Kang Choon Lee, Dong Hee Na, Donghoon Kim, Sang Hun Lee, Viktor V. Roschke, Shane A. Liddelow, Zoltan Mari, Ben A. Barres, Valina L. Dawson, et Seulki Lee. 2018. « Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease ». *Nature Medicine* 24(7):931-38.

Zarranz, Juan J., Javier Alegre, Juan C. Gómez-Esteban, Elena Lezcano, Raquel Ros, Israel Ampuero, Lidice Vidal, Janet Hoenicka, Olga Rodriguez, Begoña Atarés, Verónica Llorens, Estrella Gomez Tortosa, Teodoro Del Ser, David G. Muñoz, et Justo G. De Yebenes. 2004. « The New Mutation, E46K, of  $\alpha$ -Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia ». *Annals of Neurology* 55(2):164–173.

Zhang, Jiaming, Xiaoping Li, et Jia-Da Li. 2019. « The Roles of Post-Translational Modifications on  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases ». *Frontiers in Neuroscience* 13:381.

Zhang, Lei, Yaru Dong, Xiaoheng Xu, et Zhong Xu. 2012. « The role of autophagy in Parkinson's disease ». *Neural Regeneration Research* 7(2):141–145.

Zhang, Ling, Chunyan Zhang, Yuangang Zhu, Qing Cai, Piu Chan, Kenji Ueda, Shun Yu, et Hui Yang. 2008. « Semi-quantitative analysis of  $\alpha$ -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody ». *Brain Research* 1244:40-52.

Zhao, Hien Tran, Neena John, Vedad Delic, Karli Ikeda-Lee, Aneeza Kim, Andreas Weihofen, Eric E. Swayze, Holly B. Kordasiewicz, Andrew B. West, et Laura A. Volpicelli-Daley. 2017. « LRRK2 Antisense Oligonucleotides Ameliorate  $\alpha$ -Synuclein Inclusion Formation in a Parkinson's Disease Mouse Model ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 8(September):508-19.

Zhao, Jing, Tyler P. Molitor, J. William Langston, et R. Jeremy Nichols. 2015. « LRRK2 Dephosphorylation Increases Its Ubiquitination ». *The Biochemical Journal* 469(1):107-20.

Zhou, Jinxia, Melissa Broe, Yue Huang, John P. Anderson, Wei-Ping Gai, Elizabeth A. Milward, Michelle Porritt, David Howells, Andrew J. Hughes, Xiaomin Wang, et Glenda M. Halliday. 2011. « Changes in the Solubility and Phosphorylation of  $\alpha$ -Synuclein over the Course of Parkinson's Disease ». *Acta Neuropathologica* 121(6):695-704.

Zimprich, Alexander, Saskia Biskup, Petra Leitner, Peter Lichtner, Matthew Farrer, Sarah Lincoln, Jennifer Kachergus, Mary Hulihan, Ryan J. Uitti, Donald B. Calne, A. Jon Stoessl, Ronald F. Pfeiffer, Nadja Patenge, Iria Carballo Carbajal, Peter Vieregge, Friedrich Asmus, Bertram Müller-Myhok, Dennis W. Dickson, Thomas Meitinger, Tim M. Strom, Zbigniew K. Wszolek, et Thomas Gasser. 2004. « Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology ». *Neuron* 44(4):601–607.

Zorova, Ljubava D., Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, Savva D. Zorov, Anastasia V. Balakireva, Magdalena Juhaszova, Steven J. Sollott, et Dmitry B. Zorov. 2018. « Mitochondrial membrane potential ». *Analytical biochemistry* 552:50-59.



### The C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation is sufficient to produce neurodegeneration of dopaminergic neurons in vivo

Noémie Cresto<sup>1,2</sup>, Marie-Claude Gaillard<sup>1,2</sup>, Camille Gardier<sup>1,2</sup>, Francesco Gubinelli<sup>1,2</sup>, Elsa Diguët<sup>1,2,3</sup>, Déborah Bellet<sup>1,2</sup>, Laurine Legroux<sup>1,2</sup>, Julien Mitja<sup>1,2</sup>, Gwenaëlle Auregan<sup>1,2</sup>, Martine Guillermier<sup>1,2</sup>, Charlène Josephine<sup>1,2</sup>, Caroline Jan<sup>1,2</sup>, Noëlle Dufour<sup>1,2</sup>, Alain Joliot<sup>4</sup>, Philippe Hantraye<sup>1,2</sup>, Gilles Bonvento<sup>1,2</sup>, Nicole Déglon<sup>1,5,6</sup>, Alexis-Pierre Bemelmans<sup>1,2</sup>, Karine Cambon<sup>1,2</sup>, Géraldine Liot<sup>1,2</sup>, Emmanuel Brouillet<sup>1,2</sup> §

<sup>1</sup> CEA, DRF, Institut de Biologie Française Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRCent), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> CNRS, CEA, Paris-Sud Univ., Univ. Paris-Saclay, Neurodegenerative Diseases Laboratory (UMR9199), F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>3</sup> Institut de Recherche SERVIER, Neuropsychiatry Department, 125 chemin de ronde, 78290 Croissy sur Seine, France

<sup>4</sup> Homeoprotein and Plasticity, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), College de France, CNRS, INSERM, PSL Research University, Paris, France.

<sup>5</sup> Lausanne University Medical School (CHUV), Department of Clinical Neurosciences (DNC), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LNCM), Lausanne, Switzerland

<sup>6</sup> Lausanne University Medical School (CHUV), Neuroscience Research Center (CRN), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LNCM), Lausanne, Switzerland

§, Correspondence: emmanuel.brouillet@cea.fr

#### **Abstract**

The G2019S substitution in the kinase domain of LRRK2 (LRRK2<sup>G2019S</sup>) is the most prevalent mutation associated with Parkinson's disease (PD). Neurotoxic effects of LRRK2<sup>G2019S</sup> are thought to result from an increase in its kinase activity as compared to wild type LRRK2. However, it is unclear whether the kinase domain of LRRK2<sup>G2019S</sup> is sufficient to trigger degeneration or if the full length protein is required. To address this question, we generated constructs corresponding to the C-terminal domain of LRRK2 ( $\Delta$ LRRK2). A kinase activity that was increased by G2019→S substitution could be detected in  $\Delta$ LRRK2. However biochemical experiments suggested it did not bind or phosphorylate the substrate RAB10, in contrast to full length LRRK2. The overexpression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> in the rat striatum using lentiviral vectors (LVs) offered a straightforward and simple way to investigate its effects in neurons *in vivo*. Results from a RT-qPCR array analysis indicated that  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> led to significant mRNA expression changes consistent with a kinase-dependent mechanism. We next asked whether  $\Delta$ LRRK2 could be sufficient to trigger neurodegeneration in the substantia nigra *pars compacta* (SNc) in adult rats. Six months after infection of the substantia nigra *pars compacta* (SNc) with LV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> or LV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>, the number of DA neurons was unchanged. To examine whether higher levels of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> could trigger degeneration we cloned  $\Delta$ LRRK2 in AAV2/9 construct. As expected, AAV2/9 injected in the SNc led to neuronal expression of  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> at much higher levels than those obtained with LVs. Six months after injection, unbiased stereology showed that AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> produced a significant ~30% loss of neurons positive for tyrosine hydroxylase- and for the vesicular dopamine transporter whereas AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> did not. These findings show that overexpression of the C-terminal part of LRRK2 containing the mutant kinase domain is sufficient to trigger degeneration of DA neurons, through cell-autonomous mechanisms, possibly independent of RAB10.

#### **Highlights**

- New LVs and AAVs were developed to study the effects of a C-terminal fragment of LRRK2 containing the kinase domain

- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> produces molecular and cellular effects that are kinase activity-dependent
- *In vivo*,  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> leads to DA neurodegeneration when using AAV-mediated gene transfer

### Keywords

Parkinson's disease  
 Leucine-rich repeat kinase 2  
 Lentiviral vectors  
 AAVs

### Abbreviations

**$\Delta$ LRRK2** ROC-COR-kinase plus the WD40 domain  
**AAV** adeno-associated virus  
**ANK** Ankyrin  
**ANOVA** analysis of variance  
**ARM** Armadillo  
**ATP** Adenosine triphosphate  
**BSA** Bovine serum albumin  
**BCA** bicinchoninic acid assay  
**CamKII** Calmodulin-kinase II  
**COR** C-terminal of ROC  
**DA** Dopaminergic  
**DAB** Diaminobenzidine  
**DLU** Density light unit  
**DK** double-mutant G2019S/D1994A dead kinase  
**GFP** Green fluorescent protein  
**GS** G2019S mutation  
**GWAS** Genome-wide association studies  
**HA** Hemagglutinin tag  
**K** Kinase domain of LRRK2  
**KB1** Kinase buffer 1 (20 mM HEPES; 150 mM NaCl, 5 mM EGTA; 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate)  
**KB2** Kinase buffer 2 (10 mM ATP; 20 mM MgCl<sub>2</sub>)  
**LB** Lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1% NP40, protease inhibitors)  
**LRR** Leucin-rich repeats  
**LRRK2** Leucin-rich repeats kinase 2  
**LV** Lentivirus  
**MBP** Myelin basic protein  
**PAGE** Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis  
**PBS** Phosphate buffer saline  
**PBS-T** Phosphate Buffer Saline with 0.2% Triton X-100  
**PD** Parkinson's disease  
**RCK** Kinase domain plus the ROC-COR domain  
**ROC** Ras-of-complex protein  
**SDS** Sodium-dodecyl-Sulfate  
**SNc** Substantia nigra *pars compacta*  
**SNPs** single-nucleotide polymorphisms  
**TBS** Tris Buffer Saline  
**TBS-T** Tris Buffer Saline with 0.1% Tween-20  
**TH** Tyrosine hydroxylase  
**WT** Wild-type

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder affecting approximately seven million people worldwide. It is characterised by motor symptoms (rigidity, bradykinesia, resting tremors, gait instability) and a large spectrum of non-motor symptoms (e.g. dysosmia, sleep disorder, dementia) (Poewe, 2008; Rodriguez-Oroz et al., 2009). The neuropathological hallmarks of PD are a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNc) and the presence of neuronal inclusions (Lewy bodies) and dystrophic neurites containing aggregated  $\alpha$ -synuclein protein (Braak and Braak, 2000). The cause of DA neuron degeneration is poorly understood. PD is mostly sporadic, but a genetic origin can be found in about 10% of cases. Several genes are known to be associated with familial (or *de novo* genetic) forms of PD (Lesage and Brice, 2009).

Mutations in the *LRRK2* (Leucine-Rich Repeat Kinase 2) gene are the most common genetic cause of both familial and sporadic PD (Paisán-Ruiz et al., 2004). Genome-wide association studies (GWAS) have also identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at the *LRRK2* locus significantly associated with an increase or a decrease in the risk of developing PD, consistent with a key role for LRRK2 in PD pathogenesis (Nalls et al., 2014; Satake et al., 2009). It has also recently been shown that LRRK2 was activated (increased autophosphorylation and increased phosphorylation of its substrate RAB10) in the SNc of sporadic PD patients (Di Maio et al., 2018). The most prevalent pathogenic mutation of LRRK2 is the G2019S substitution (Gilks et al., 2005; Healy et al., 2008).

The mechanisms underlying the neurotoxicity of the G2019S mutant LRRK2 protein (LRRK2<sup>G2019S</sup>) are unknown (Cresto et al., 2019). *LRRK2* gene encodes a large 2527-amino acid multidomain protein. The pathogenic mutations of *LRRK2* are clustered in the central region encoding the three domains forming the catalytic (kinase) core of the protein (Cookson, 2010; Mata et al., 2006). The G2019S mutation affects an amino acid located in this kinase domain. LRRK2 belongs to the ROCO protein family, and bears the tandem Ras-of-complex proteins (Roc), GTPase and C-terminal of Roc (COR) domains characteristic of this family. LRRK2 also has regions involved in protein-protein interactions [ankyrin (ANK), armadillo (ARM), leucine-rich repeats (LRR)] at its N-terminal and a WD40 domain at its C-terminal, suggesting a possible function as a scaffolding protein. The G2019S mutation increases LRRK2 kinase activity (both auto-phosphorylation and the phosphorylation of substrates) and there is compelling evidence to suggest that the neurotoxicity of LRRK2<sup>G2019S</sup> is linked to an increase in the kinase activity of this protein (Lee et al., 2010a; West et al., 2007). Recent results obtained in transgenic mice expressing LRRK2 in non-dopaminergic neurons show that full length LRRK2<sup>G2019S</sup> is no longer neurotoxic when its kinase domain is inactivated (e.g. D1994E mutation), which demonstrates that the activity of the kinase domain is crucial for toxicity (Xiong et al., 2017). In support of this, a number of studies showed that pharmacological inhibitors of the kinase can produce neuroprotection against mutant LRRK2 (for a review see Cresto et al, 2019). However, it is unclear whether the kinase domain of LRRK2<sup>G2019S</sup> is sufficient to trigger degeneration or if the full length protein is required. Several reports indicated that truncated fragments of LRRK2 can produce cellular changes that depend on the activity of the kinase domain, indicating that the entire protein may not be required to trigger some of LRRK2 signalling/biological functions (Aufschnaiter et al., 2018; Pereira et al., 2014; Sheng et al., 2010). This question is not purely theoretical. It may have practical implications. Especially, apart from existing compounds that produce LRRK2 kinase inhibition, other types of strategies (peptide, aptamers etc...) selectively impeaching the interaction of the kinase domain with its substrates (without interfering with non-kinase-dependent LRRK2 functions associated with the N-terminal domain for example) may also be of interest.

The role of the LRRK2 kinase domain in dopaminergic (DA) neurons has rarely been studied *in vivo*. Transgenic and knock-in genetic models expressing LRRK2<sup>G2019S</sup> have been developed in rodents. These animals display very progressive motor deficits, subtle defects in striatal DA release, but little or no DA neuron loss, even at two years of age (Beccano-Kelly et al., 2014; Lee et al., 2015; Ramonet et al., 2011; Yue et al., 2015). This is likely due to the low expression of LRRK2 in DA neurons in these models. Double transgenic mice expressing high levels of LRRK2 under the control of the CamKII and Tet promoters show progressive degeneration of neurons in the cortex and striatum (Lin et al., 2009), whereas the SNc is spared since CamKII induces minimal expression in DA cells. Of major interest, a recent report showed that expression of LRRK2<sup>G2019S</sup> under the control of the TH promoter leads to robust degeneration of DA neurons and a severe behavioural phenotype

(Xiong et al., 2018). These results suggest that high levels of LRRK2<sup>G2019S</sup> expression are required to trigger cell death in the SNc. In support of this hypothesis, intrastriatal injection of an HSV amplicon (HSV) and an adenovirus (Adeno) encoding LRRK2<sup>G2019S</sup> in the mouse and rat striatum respectively, produces a partial but relatively rapid degeneration of DA neurons (Dusonchet et al., 2011; Lee et al., 2010a). It was also shown recently that overexpression of LRRK2<sup>G2019S</sup> in SNc after injection of canine-Adeno viral vectors (CAV2) in the striatum leads to partial degeneration of dopaminergic neurons in the SNc in the primate *microcebus murinus* (Mestre-Francés et al., 2018). Although these vectors do not transduce DA neurons alone (striatal neurons and astrocytes are transduced as well), these new studies demonstrate that local brain infection with viral vectors might be a versatile approach to study mutant LRRK2 pathophysiology *in vivo* in different animal species. Here, we investigated whether an increase in the kinase activity of LRRK2<sup>G2019S</sup> selectively in DA neurons could lead to cell-autonomous neurodegeneration. We addressed this question *in vivo*, in the context of the DA neurons of the SNc in rats. We used lentiviral vectors (LVs) and adeno-associated viruses (AAV2/9), which can overexpress transgenes selectively in neurons. In this study, we generated lentiviral vectors (LVs) encoding the C-terminal part [1326-2527 a.a., called hereafter “ $\Delta$ LRRK2”] of the wild-type ( $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup>), G2019S mutant ( $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>) or double-mutant G2019S/D1994A dead kinase ( $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup>) forms of LRRK2. Since our results showed that LV-mediated overexpression of  $\Delta$ LRRK2 produced no significant toxicity in dopaminergic neurons *in vivo*, we generated AAV2/9 encoding  $\Delta$ LRRK2 fragments and tested the potential neurotoxic effects of these AAVs after their stereotaxic injection into the SNc of adult rats. Effects of vectors coding  $\Delta$ LRRK2 were mainly evaluated using behavioural motor tests and histological evaluation of the nigro-striatal pathway (See Supplementary Fig. S1 for general design of *in vivo* experiments in rats).

## **Materials and methods**

### **Viral construction and production**

**Lentivirus.** DNA sequences encoding GFP and the C-terminal part of human LRRK2 (kinase,K; ROC-COR-kinase, RCK; RCK plus the WD40 domain, called hereafter “ $\Delta$ LRRK2”) were synthesised and inserted into the self-inactivated vector (SIN) backbone containing the WPRE element (W) and the murine ubiquitous phosphoglycerate kinase 1 promoter (PGK). We generated lentivirus vectors LV-GFP, and LV- $\Delta$ LRRK2 coding for the WT form or G2019S forms of the fragments. Viral particles were produced as described elsewhere (Hottinger et al., 2000). All the SIN vectors were pseudotyped with VSVg glycoprotein G. Briefly, the viral particles were produced in HEK-293T cells by a four plasmid transient transfection system (Naldini et al., 1996). The supernatant was collected 48 hours later and filtered, and the particle content of the viral batches was determined by ELISA for the p24 antigen (Gentaur, Paris, France). High-titre stocks were obtained by ultracentrifugation. The pellet was re-suspended in 1% BSA in PBS, frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . LV- $\Delta$ LRRK2 vectors were used at a concentration of 100 ng/ $\mu\text{l}$  p24.

**Adeno-associated viral vector (AAV).** Plasmid constructs were packaged into AAV2/9 capsids as described previously (Berger et al., 2015). Briefly, viral particles were produced by co-transfection of HEK-293T cells with (1) an adenovirus helper plasmid (pXX6-80), (2) an AAV and expressed as viral genomes per ml of concentrated stocks (Vg/ml) (Aurnhammer et al., 2012).

### **Cell studies**

Human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were grown at  $37^{\circ}\text{C}$  in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% bovine calf serums, under an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . For the study of recombinant  $\Delta$ LRRK2, cultured cells were seeded on wells and transfected by calcium phosphate transfection methods with the different forms of  $\Delta$ LRRK2 vectors. For RAB10 immunoprecipitation studies with the  $\Delta$ LRRK2 fragments, a stable HEK 293T cell line was generated using lentivirus infection. The  $\Delta$ LRRK2 cell lines (LacZ, WT, GS, DK) were maintained as the parental HEK described just above.

### **Biochemical analysis**

**Western blotting.** Overall levels of fragment expression were determined by lysing cells in modified RIPA buffer (without SDS): 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1% NP40 and protease

inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were centrifuged at 13,000 x g for 20 min at 4°C. The supernatant was collected, and dispensed into aliquots, which were stored at -80°C to prevent degradation. A fraction was retained for the determination of total protein concentration with a BCA kit (Pierce). Equal amounts of total protein extract were subjected to SDS-PAGE in 4 to 12% Bis-Tris gels (NuPAGE Novex Bis-Tris midi gel; 15 or 26 wells, Invitrogen) and the bands were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked (5% milk in TBS-0.1% Tween-20) and incubated overnight with primary antibodies against actin (1:5000, rabbit, Sigma), and, for the detection of transgenes, with antibodies against HA (1:3000, mouse, Covance). The membranes were washed three times, with 0.1% Tween-20 in TBS (TBS-T), for 10 min each. For chemo-luminescence-based detection, membranes were labelled for 1h with secondary IgG-HRP antibodies raised against the corresponding primary antibodies. The membranes were washed three times with TBS-T and incubated with ECL chemo-luminescence reagent (Clarity Western ECL substrate; Bio-Rad), according to the supplier's instructions. Peroxidase activity was detected with the Fusion TX7 camera system (Fisher Scientific). Signals were normalized against the actin signal, by densitometry analysis with ImageJ software. For fluorescence-based detection, membranes were labelled for 1h with secondary IgG-coupled with fluorescent dyes (Li-cor Biosciences, Germany). The fluorescent signal was then visualized using Odyssey CLX Imager (Li-cor Biosciences, Germany) and analysis performed using Image Studio software (Li-cor Biosciences, Germany).

Immunoprecipitation of LRRK2-HA fragments. Lysates of transfected HEK cells were used for the immunoprecipitation protocol. In total, 750 µg protein, as determined with the BCA kit, was mixed in 500 µl of lysis buffer (LB) and a 1:150 dilution of HA antibody was added. The mixture was incubated overnight at 4°C, with 360° rotation, to allow the protein-antigen complex to form. The next day, 20 µl of magnetic beads coated with protein A/G (Dynabeads NOVEX, Life Technologies) were washed three times in LB. The tube containing the beads was placed on a magnet, causing the beads to migrate to the side of the tube facing the magnet, thereby facilitating supernatant removal. The protein-antigen complex was added to the beads, and the mixture was incubated at room temperature for 2 hours to allow the bead-Ab-Ag complex to form. The supernatant was removed and the beads were washed three times in LB.

Immunoprecipitation of RAB10. Lysates of HEK stable cells for ΔLRRK2 or calcium phosphate transfected HEK cells for full length LRRK2 were obtained using a lysis buffer (LB; 50mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail and 1% phosphatase inhibitor cocktail). Lysate was centrifuged at 15000 g for 10 minutes at 4°C and supernatant was collected to perform a total protein assay (BCA kit). Magnetic beads coated with protein A/G (Dynabeads NOVEX, Life Technologies) were incubated with 2 µl (= 1µg) of RAB10 antibody during 1h at 4°C. Next, 30 µl of this complex RAB10 Antibody/magnetic beads was incubated with 500 µg of total proteins in 500 µl of lysis buffer during 2 hours at 4°C on rotation. After 3 washes with the lysis buffer, proteins were denaturated with Laemmli buffer and submitted to SDS-PAGE in 4-20% Tris-Glycine gels (Bio-Rad). Detection of corresponding western blots was performed with: anti RAB10 Ab (Abcam), anti-phospho-RAB10 T73 (Abcam), anti-HA (Covance), anti-Actin (Sigma), anti-tubulin (Sigma). The secondary antibody used for detection of Rab10 and Phospho-RAB10 was the Clean-Blot IP Detection Reagent-HRP (Thermo Fisher).

Kinase activity assay. The lysate buffer (LB) was removed and the beads-Ab-Ag complex was resuspended in 30 µl of kinase buffer (KB1: 20 mM HEPES; 150 mM NaCl, 5 mM EGTA; 20 mM beta-glycerophosphate). The mixture was split into two samples (10 µl and 20 µl), one for estimation of the amount of protein (non-radioactive fraction) and the other for a phosphorylation activity assay with MBP. For measurements of phosphorylation activity, we added 5 µl of KB2 (10 mM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) and 5µCi <sup>32</sup>P-ATP (1 mCi, BLU502Z001MC, PerkinElmer) to activate the reaction, and the mixture was then incubated at 30°C for 30 min with gentle agitation. The denaturation buffer was added and the mixture was heated at 90°C for 5 minutes to complete the denaturation process. The beads were isolated with the magnet, the supernatant was loaded in 4 to 12% Bis-Tris gels. For the non-radioactive fraction, we performed western blotting as described above, in the section on "biochemical analyses". The radioactive blot was dried onto Whatman filter paper for two hours. The dried-down gel was then placed against a phosphor screen. Two hours of incubation were sufficient

for the detection of radiolabelled phosphorylated proteins. The phosphor screen was scanned with a Cyclone Plus machine (Perkin Elmer) and the number of DLU (density light unit) was determined with the software provided.

#### Stereotaxic injection

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories) weighing ~250 g were housed under a 12 h light/12 h dark cycle, with *ad libitum* access to food and water, in accordance with European Community (Directive 2010-63/EEC) and French (Code Rural R214/87-130) regulations. Experimental procedures were approved by the local ethics committee and registered with the French Research Ministry (committee #44, approval #12-100 and APAFIS#1372-2015080415269690v2). For stereotaxic injections, the animals were deeply anaesthetised with 4% isoflurane followed by a mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and placed in a stereotaxic frame. Recombinant lentiviruses and adeno-associated viral vectors were injected bilaterally into the substantia nigra, at the following stereotaxic co-ordinates: +3.4 mm anterior to the interaural zero and  $\pm 2.0$  mm lateral to bregma, at a depth of -7.8 mm relative to the skull, with the tooth bar set at -3.3 mm (Supplementary Fig. 1, B and F). For striatal injections of lentiviral vectors, the following coordinates were used: +0.86 mm anterior to the interaural zero and  $\pm 4.0$  mm lateral to bregma, at a depth of -4.5 mm relative to the skull, with the tooth bar set at -3.3 mm. We injected 2  $\mu$ l of virus (200 ng for lentiviruses and  $5 \times 10^{10}$  viral particles for AAV into each site), with a 34-gauge blunt-tipped needle linked to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe by a polyethylene catheter, at a rate of 0.25  $\mu$ l/min, with an automatic pump (CMA-4004). The needle was left in place for five minutes and was then slowly withdrawn.

#### Behavioural analysis

The Catwalk method (Noldus information Technology, Wageningen, the Netherlands) is an automated and computerised gait-analysis technique for the objective quantification of multiple static and dynamic gait parameters. The following gait parameters were calculated: intensity of the paw print intensity, print length, print width, print area (surface area of the complete print), stand, swing (duration for which there was no contact with the glass plate in a step cycle), swing speed (speed of the paw during swing), stand index, stride length (the distance between successive placements of the same paw), and angle. All rats were trained to cross the runway in a consistent manner, during at least three training sessions per day, before the experiment was begun. Analysis was performed on a minimum of three normal step sequence patterns in each uninterrupted run.

#### Tissue processing

For all procedures, rats were first deeply anaesthetised by isoflurane inhalation followed by the intraperitoneal injection of a lethal dose of sodium pentobarbital.

For immunohistochemistry, rats were transcardially perfused with 300 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer at a rate of 30 ml/min. After perfusion, the brain of each rat was removed quickly and immersed in ice-cold 4% paraformaldehyde for at least 24 h, before transfer to 15% sucrose for 24 hours and then 30% sucrose the next day, for cryoprotection. The brains were then cut into 40  $\mu$ m sections on a freezing microtome (CM1900, Leica, Germany). Serial sections of the striatum and midbrain were stored in antifreeze solution (30% sucrose, 30% ethylene glycol in PBS) until use.

#### Immunohistological analysis and quantification

Immunohistochemistry. The sections were removed from the antifreeze solution and washed in PBS. Endogenous peroxidase activity was quashed by transferring these sections to 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes at room temperature (RT) and washing them three times with PBS, for 10 min each. The sections were then blocked by incubation with 4.5% normal goat serum for 30 min in PBS-T (0.2% Triton X-100 in PBS) and they were then incubated overnight with primary antibody in 3% normal goat serum in PBS-T, at 4°C, with gentle shaking (anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody: MAB318 clone LNC1, 1:3000; anti-hemagglutinin tag (HA), Covance clone 11, 1:1000). The next day, these sections were removed from the primary antibody solution, washed three times and incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate biotinylated secondary antibody in PBS-T (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, 1:1000). The sections were then washed and incubated with

ABC complex solution in PBS-T (1:250, reagents A and B combined in a 1:1 ratio, Vector Laboratories) for 1 h. The sections were then incubated with DAB for 30 s to 1 min and mounted on slides, in Eukitt mounting medium.

Cell counting. Optical fractionators sampling was carried out on a Zeiss microscope AxioPlan. Midbrain dopaminergic neurons were outlined on the basis of TH immunolabelling, with reference to a coronal atlas of the rat brain (Paxinos and Watson, 6<sup>th</sup> edition). For the lentiviral-mediated transduction of DA neurons, TH-positive cells in vicinity of the injection site were counted and the number of positive neurons per section was calculated with Mercator Software (Explora Nova, France). We placed 100 × 100 µm grids in a systematic random manner, 80 × 80 µm apart, with a 3 µm offset from the surface of the section. Quantification was performed on five serial sections spaced by 200 µm, from the anterior to the middle of the SNc, corresponding to the infection volume. For the AAV-mediated transduction of DA neurons, TH-positive cells were evaluated by unbiased stereology in the entire SNc. The same parameters were used as described above.

Immunofluorescence. The procedure used was similar to that for immunohistochemistry, but without the incubation in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The primary antibodies used for the immunofluorescence procedure were directed against TH (AB152 1:1000, EMD Millipore, US) and HA (Covance clone11, 1:1000). On the first day, sections were incubated with the primary antibody against TH overnight at 4°C. The next day, they were incubated with a fluorescent secondary antibody: Alexa Fluor 594-labeled goat anti-rabbit IgG (1:1000, Life Technologies) for 1 hour at RT. The sections were then washed and incubated overnight at 4°C with another primary antibody directed against HA. Finally, they were incubated with a second fluorescent secondary antibody, Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG (1:1000, Life Technologies) for 1 hour at room temperature. The sections were stained with DAPI, washed and mounted in a fluorescence mounting medium. Images were acquired with a laser confocal microscope (SP8, Leica, Germany) or an epifluorescence microscopy (DM8000, Leica, Germany).

Measurement of transduction volumes after lentiviral injection in the substantia nigra. Transduction volume was evaluated by epifluorescence microscopy. Serial sections were taken from each animal: five to six sections 400 µm apart, covering the entire SNc. The SNc was segmented on the basis of TH staining, analysed in the red channel, and the area was measured. TH segmentation was analysed in the green channel, corresponding to HA staining, and the zone of positive green staining within the TH area was segmented and measured. The transduction volume was calculated from the percentage of transduction measured for each section.

#### Real-time quantitative PCR

The transcriptomic analysis was performed on rat striatum, to ensure that it was performed on a relatively homogeneous population of transduced neurons. Rats were infected with the different LVs coding for ΔLRRK2 and LV-GFP. The striatal region displaying fluorescence was dissected out with a circular punch (1.5 mm in diameter) from 1 mm-thick fresh coronal brain sections visualised under a fluorescence binocular microscope (Leica). The punch samples were crushed and stored in Trizol solution (Life Technologies) at -80°C before processing. Total RNA was treated with DNase RQ1 and reverse-transcribed with the SuperScript™ III reverse transcriptase (VILO kit, Life Technologies). The rat Huntington's disease RT<sup>2</sup> profiler PCR array (Qiagen) was used to evaluate gene expression directly and to assess potential involvement in striatal disease. cDNAs were generated in accordance with the array manufacturer's instructions. The list of the 88 mRNA analysed can be found at <https://www.qiagen.com/be/shop/genes-and-pathways/complete-biology-list/huntingtons-disease/>. A statistical analysis was performed to identify genes upregulated or downregulated in the GS group relative to the WT or dead kinase (DK) group. The expression of the genes identified with the RT<sup>2</sup> profiler PCR array were checked in SYBR Green-based real-time quantitative RT-PCR assays performed in triplicate with the *Taq* Platinum enzyme (SYBR Green qPCR kit, Invitrogen) on a Master cycler Realplex system (Eppendorf) with different primers designed and validated in house (Supplementary Table 1).

### Statistical analysis

Data were analysed by two-tailed, one-way analysis of variance (ANOVA) performed with Statistica software (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and, when appropriate, Bonferroni post hoc correction for multiple comparisons was applied. Unpaired Student's *t*-tests were performed for pairwise comparisons. For the analysis of gene array, results (n=6/group) showed that data distribution was not normal so that non-parametric tests were used. When Kruskal-Wallis test showed significance, Mann-Whitney *post hoc* test was applied for comparison between groups. The annotations used to indicate the level of significance are as follows: \**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001.

## Results

### Functional and biochemical characterisation of $\Delta$ LRRK2

The expression of the different fragments was first evaluated *in vitro* after the transfection of HEK293T cells with expression vectors encoding the K, RCK or RCKWD40 ( $\Delta$ LRRK2) [1326-2527 a.a.] fragments of LRRK2, with or without the G2019S mutation (Fig. 1, A). We added an HA tag to the C-terminus of all constructs. RT-qPCR analysis after transfection showed that mRNA coding for K, RCK and  $\Delta$ LRRK2 were not expressed at statistically different levels, although the larger fragment  $\Delta$ LRRK2 tended to be less expressed compared to the smaller fragments (Fig. 1, B). After protein extraction in buffer with non-ionic detergents (NP40 and Triton X100), western blot analysis based on detection of the HA tag showed that the fragments migrated at their expected molecular weights: 30 kDa for K, 100 kDa for RCK and ~143 kDa for  $\Delta$ LRRK2, demonstrating an absence of abnormal cleavage or instability (Fig. 1, C). The detection and the quantification of protein levels were done with the HA tag. Only for the K fragment, a small but significant difference was seen between the expression of the G2019S form when compared to the WT form (Fig. 1, D). RCK and RCKWD40 ( $\Delta$ LRRK2) forms tended to be much less expressed than the smaller fragment K but no significant differences were seen between RCK<sup>WT</sup> and RCK<sup>G2019S</sup> or  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>. To better focus on the comparison between  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>, we repeated the transfection experiment, protein extraction and quantification of western blot for this long fragment (Fig. 1, E). No difference of expression was detected between  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (Fig. 1, F).

We next asked whether the kinase activity of  $\Delta$ LRRK2 could be detected. For this purpose a kinase activity assay with <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP in the presence of the pan-kinase substrate myelin basic protein (MBP) was performed (Galvan et al., 2018). The higher level of kinase activity observed with LRRK2<sup>G2019S</sup> compared to wild-type LRRK2 is thought to be a key molecular aspect of its neurotoxicity (Lee et al., 2010b; West et al., 2007). This increase in kinase activity is dependent on adjacent functional domains: the presence of the ROC domain facilitates LRRK2 kinase activity and synergistically enhances G2019S-induced kinase activity (Lewis et al., 2007; Smith et al., 2006; Webber et al., 2011). For these reasons, we assessed the biochemical activity of  $\Delta$ LRRK2 in comparison with two other "shorter" fragments containing the kinase domain. The three recombinant fragments containing the G2019S substitution (kinase, K<sup>G2019S</sup>; ROC-COR-kinase, RCK<sup>G2019S</sup>; RCK-WD40<sup>G2019S</sup> i.e.  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>) were purified by HA-mediated immunoprecipitation after the transfection of HEK cells. In this radioactive assay with <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP, the radioactivity of the different kinase fragments was assessed after immunoprecipitation and separation by SDS-PAGE. Only  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> displayed detectable autophosphorylation similar to that reported in previous studies for the (1326-2527 aa)  $\Delta$ LRRK2 (Shogo Kamikawaji et al., 2016). The K<sup>G2019S</sup> and RCK<sup>G2019S</sup> fragments displayed no detectable autophosphorylation in our assay. An analysis of <sup>32</sup>P incorporation into the MBP substrate was performed to determine the phosphorylation activity of the different fragments. In parallel, the levels of immune-precipitated recombinant fragments were evaluated by western blotting with an antibody directed against the HA tag (see Fig. 2, non-radioactive fraction). K<sup>G2019S</sup> and RCK<sup>G2019S</sup> had similar low levels of kinase activity (Fig. 2, A-C). Conversely,  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> had much higher level of phosphorylation activity than the smaller fragments. We then compared the catalytic activity of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> with that of the corresponding wild-type form,  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup>. MBP phosphorylation levels were higher with  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> than with  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup>, suggesting that the G2019S substitution had indeed increased the kinase activity of this long C-terminal fragment of LRRK2 (Fig. 2, D-E).



We also studied RAB10 phosphorylation in presence of the different forms of  $\Delta$ LRRK2 in HEK cells infected with lentivirus to produce stable cell lines or in HEK transfected with the full length LRRK2. Results were congruent with the literature. Only the overexpression of full length LRRK2<sup>WT</sup> and LRRK2<sup>G2019S</sup> produced an increase in phospho-RAB10 while total levels of (non-phosphorylated) RAB10 remained unchanged (Supplementary Fig. S2, A, B). In our hands, the double dead mutant LRRK2<sup>DK</sup> produced no increase in phospho-RAB10, but the expression levels of this double mutant was found to be always low, possibly as a result of its abolished autophosphorylation which should accelerate its degradation as reported for LRRK2 (Lobbestael et al., 2016). We next used RAB10 as bait in co-immunoprecipitation experiments to investigate whether full length LRRK2 could be pulled down with RAB10. Results showed that both full length LRRK2<sup>WT</sup> and LRRK2<sup>G2019S</sup> could be detected in the immunoprecipitate (Supplementary Fig. S2A, C). Similar experiments using HEK cells were carried out in parallel with  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> to determine whether these fragments could interact with RAB10 (Supplementary Fig. S2B, D). Results showed no detectable change in RAB10 phosphorylation in presence of  $\Delta$ LRRK2 fragments.  $\Delta$ LRRK2 fragments were not detected in the immunoprecipitate, indicating no major interaction with RAB10 (Supplementary Fig. S2B, D).

The preliminary biochemical characterization thus suggested that  $\Delta$ LRRK2 displays a kinase activity. It also indicated that the molecular “switch” induced by G2019S mutation was preserved in the  $\Delta$ LRRK2 constructs, as previously reported for the LRRK2 protein (Jaleel et al., 2007). However,  $\Delta$ LRRK2 fragments do not phosphorylate the substrate of full length LRRK2, RAB10, consistent with the reported importance of the serines (S910 and S935) in the N-terminus of LRRK2 for its interaction with RAB10 and other RAB proteins (Liu et al., 2018; Steger et al., 2017).

#### Transcriptomic analysis of LRRK2 fragments in vivo

We investigated whether the overproduction of LRRK2 fragments had a biological effect in neurons *in vivo*. We used a straightforward and simple approach in order to target a homogeneous population of transduced neurons (which could not be done easily in the SNc to obtain a sufficient amount of neurons) and after resection of the transduced region perform a mRNA expression analysis. We chose the striatum, a region which does not degenerate in LRRK2<sup>G2019S</sup> carriers, but is naturally enriched in LRRK2 (Brochier et al., 2008; Higashi et al., 2007). In these experiments, we aimed to assess the effect of LV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> relative to that of LVs encoding GFP,  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup>, the kinase-dead form of  $\Delta$ LRRK2. The mutation D1994A is known to abolish kinase activity and was therefore used as a negative control for kinase activity (Smith et al., 2006). For the selective collection of transduced striatal tissue, we co-injected in rats LVs encoding  $\Delta$ LRRK2 (100 ng p24/ $\mu$ l) with LV-GFP (50 ng p24/ $\mu$ l) (Fig. S3). Six weeks later, we measured the expression levels of 84 striatal genes using a commercial RT-qPCR array (see Materials and methods) (Fig. 3). RT-qPCR was also performed to compare the mRNA levels for the three  $\Delta$ LRRK2 transgenes and we found no significant difference between the three transgenes (Fig. 3, A). The statistical analysis of expression profiles for the 84 genes showed that overexpression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> resulted in significant changes in the expression of eight genes, when compared to  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup> (Fig. 3, C-E). This suggested that an increase in kinase activity was required for this effect in neurons *in vivo*. The changes in expression for these genes were confirmed with a different RT-qPCR method (data not shown, primers used for RT-qPCR in Supplementary Table S1). Consistent with the lack of obvious toxicity *in vivo*, no difference was observed in the expression of genes directly related to apoptosis mechanisms (Akt, Bax, and Casp3) (Fig. 3, B).  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> overexpression induced changes in mRNA levels for genes directly related to neurotransmission/cell signalling: *Tac1* (preprotachykinin/substance P), *Grin2a* (NMDA receptor subunit A), *Cnr1* (cannabinoid receptor 1), *RGS4* (regulator of G protein signalling 4) and *HPCA* (hippocalcin) were significantly downregulated in the  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> group relative to the other three groups (Fig. 3, C-D). The levels of *Snap25* (synaptosomal-associated protein 25) and *Rph3a* (rabphilin 3a) mRNA were significantly lower following transduction with a LV encoding  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> than after transduction with LVs encoding the WT and dead-kinase forms of the  $\Delta$ LRRK2 fragment (Fig. 3, D). For one gene, encoding *Bbox1* (gamma-butyrobetaine dioxygenase, the enzyme responsible for L-carnitine synthesis) mRNA levels in the  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> group were more than three times those

in the other groups (Fig. 3, E). These results therefore indicate that overexpression of  $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$  can produce perturbations in neurons *in vivo*.

#### Characterisation of LVs-induced transduction in the rat substantia nigra

LVs with the VSV-G envelope and coding for proteins under the control of PGK promoter are known to almost exclusively express transgenes in neuronal cells in the brain (Francelle et al., 2015; Galvan et al., 2018). We checked with LV-GFP that it was also the case in the SNc in rats. Double immunofluorescence studies showed no expression in astrocytes or microglial cells (Supplementary Fig. S4). At low magnification, after infection with LV- $\Delta\text{LRRK2}$ , the HA tag was detected in a large proportion of cells reminiscent of neurons in the SNc (Fig. 4, A). Confocal analysis showed that, close to the injection site, about 90% of TH-positive (DA) neurons labelled with an antibody directed against tyrosine hydroxylase (TH) were transduced and displayed strong HA-positive immunofluorescence signal in the cytoplasm and dendrites (Fig. 4, B). The pattern and intensity of fluorescence were similar for both  $\Delta\text{LRRK2}$  forms (Fig. 4 A, B). As for LV-GFP, transduction of cell types other than neurons has never been observed with LV- $\Delta\text{LRRK2}$ . Quantification of the volume of SNc transduced after infection with the different LVs coding for  $\Delta\text{LRRK2}$  showed that approximately 30% of the SNc was transduced (mostly its anterior part) and no significant differences were seen between LV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$  and LV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$  (Fig. 5, A-D).

#### *In vivo* experiments with LVs to study the potential toxic effects of LRRK2 fragments

We evaluated the potential toxicity of LV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$  or LV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ . LVs were injected into the SNc of WT rats (200 ng per site). We injected LVs encoding the WT form of  $\Delta\text{LRRK2}$  into the left hemisphere, and LVs encoding the G2019S form, which we thought might be toxic, into the right hemisphere. In addition, a control group received injections of vehicle (PBS/BSA) and a LV encoding GFP. Pilot experiments with lentiviral vector and AAVs (not shown) indicated no obvious degeneration in the SNC and no behavioral (motor) abnormalities at 10 and 15 weeks post-infection respectively. We reasoned that degeneration could occur very progressively, so we chose a 25 weeks (6 months) time point. Rats were subjected to the Catwalk<sup>®</sup> test 25 weeks after injection, for the detection of motor deficits and three days later, the rats were euthanatized for histological evaluation.

We hypothesised that asymmetric abnormalities would be detected when the animals were crossing the elevated board, if the fragments harbouring the G2019S substitution resulted in a dysfunction of DA neurons after LV infection. We evaluated nine different gait parameters (Supplementary Fig. S5), including maximal contact area, mean stride length and mean swing speed, which have been reported to be altered in rat models of motor deficits (Vandeputte et al., 2010; Zhou et al., 2015). We analysed the right limb, corresponding to the left SNc infected with LVs encoding the WT form of  $\Delta\text{LRRK2}$ , and the left front limb, corresponding to the right SNc infected with LVs encoding the G2019S form, separately. No significant asymmetry was observed 25 weeks after injection, for any of the parameters studied (Supplementary Fig. S5). Overall, the nine parameters studied did not differ between the rats infected with LRRK2 fragments and the rats receiving injections of PBS/BSA and LV-GFP.

We then investigated the integrity of the nigrostriatal pathway, by counting the dopaminergic neurons, which displayed TH staining, in the injected part of the SNc (Fig. 6, A and B). Low-magnification observations revealed no marked loss of TH-positive cells, even in the vicinity of the injection site (Fig. 6, A). As mentioned above, only a fraction (~30% on average) of the SNc cells was transduced, and these cells were close to the injection site, due to the limited diffusion of LVs. Thus, we assumed that the total loss would be limited (20-30% at most) and “diluted”, making it difficult or impossible to detect this loss by determining the total number of TH-positive cells in the entire rostro-caudal extension of the SNc. We therefore counted TH-positive cells close to the injection site (-4.0 to -4.8 mm rostro-caudal from bregma) and determined relative densities. The apparent density of TH-positive cells in this part of the SNc did not differ significantly between wild-type and G2019S  $\Delta\text{LRRK2}$ , or between these fragments and the control (GFP) (Fig. 6, B). In conclusion, no significant differences were observed between the groups expressing  $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$  and  $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ .

### Comparison between AAVs and lentiviral transduction

We hypothesized that the lack of neurotoxicity observed with lentiviral-mediated transduction of DA neurons could be due to the low level of transgene expression in comparison with what could be observed with AAVs. We compared the transduction efficacy of lentiviruses and AAVs encoding for the GFP protein at 1 month after stereotaxic injection. Results showed that the transduction by AAVs was higher than that obtained with LVs by approximately 10 fold (Fig. 7, A, B). Moreover, the transduction of cells by the AAV2/9-GFP was continuous throughout the SNc, which was not the case for the LV-GFP (Fig. 7, C).

As described for the LVs experiments, we carried out immunofluorescence analyses after infection with AAV-GFP to assess the transduction of neurons in the SNc as compared to other cell types. Results showed that GFP expression was almost exclusively seen in neurons (Supplementary Fig. S4).

### Characterisation of AAVs-induced transduction in the rat substantia nigra

Next, AAV2/9 vectors encoding either  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> or  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> under the PGK promoter and with a HA tag were injected into the SNc of adult rats. AAV preparations (batches) were diluted to similar concentrations ( $5 \times 10^{10}$  viral particles/ $\mu$ l) and 2  $\mu$ l of the final preparation was injected to determine the distribution of the wild-type and mutant  $\Delta$ LRRK2 fragments in the SNc. Histological evaluations showed that all transduced cells expressing  $\Delta$ LRRK2 (WT or G2019S) had a neuronal phenotype. Apart from neurons, no other transduced cell types were observed. Immunofluorescence detected by confocal microscopy of the HA tag was localized in the cytoplasm, with some punctate structures at 10 weeks P.I. (Fig. 8, A, B). Using immunohistochemical detection of  $\Delta$ LRRK2-HA and bright field microscopy, the neuronal staining appeared mainly diffuse in the cytoplasm without major punctate staining and dendrites could also be observed (Fig. 9, A-P). Similar levels of expression were observed between AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>.

### In vivo experiments with AAVs, to study the potential toxic effects of $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>

We evaluated the potential toxicity of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> or AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> to dopaminergic neurons *in vivo* after their injection into the SNc. In this case, AAVs were injected bilaterally into the SNc. A control group received injections of vehicle (PBS pluronic acid). We evaluated nine different gait parameters in the CatWalk test. No significant changes were observed 25 weeks after injection, for any of the parameters studied. Overall, the nine parameters studied did not differ between the rats infected with LRRK2 fragments and the rats who received injections of vehicle (Supplementary Fig. S6). Rats were also subjected to the open field test to evaluate the spontaneous locomotion activity. No significant motor alteration was detected in this test (data not shown).

We then investigated the integrity of the nigrostriatal pathway, by counting the dopaminergic neurons, which displayed TH staining, in the SNc (Fig. 10, A). In the case of AAVs, because of their good diffusion in the entire SNc, we counted TH-positive cells by unbiased stereology. The number of TH-positive cells, 25 weeks after infection, differed significantly between rats infected with AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (Fig. 10, A). The number of neurons was similar between the PBS group and the  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> with approximately 10,000 neurons counted. We observed a 30 % decrease of TH positive neurons in the group injected with  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> as compared to the two others groups. Since apparent TH loss could be linked to a selective down regulation of the protein, we also counted by stereology the number of cells positive for the vesicular monoamine transporter (VMAT). A statistically significant loss of VMAT positive cells was also found (Fig. 10, B).

In conclusion, neuronal overexpression of  $\Delta$ LRRK2 with the G2019S missense mutation but not its WT form induced neurodegeneration of the nigro-striatal pathway six months after the injection of the AAVs.

### Discussion

The toxicity of the mutant LRRK2 is thought to be related to an increase in the activity of its kinase domain. This hypothesis is particularly well supported for the G2019S substitution. In this study, we used lentiviral and adeno-associated viral vectors to express the C-terminal part of LRRK2 harbouring the G2019S mutation in the

DA neurons of the rat SNc. Biochemical experiments demonstrated that the largest fragment with the G2019S substitution studied here ( $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>) was “biochemically” active *in vitro* and induced changes in cells when overproduced *in vivo* in neurons. While quantitative histological studies indicated that the overexpression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> via LVs did not result in a loss of TH-positive DA neurons, results with AAVs showed that  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> induced a 30 % loss of DA neurons.

A biochemical comparison of the three different types of C-terminal fragments of LRRK2 performed before the insertion of these fragments into lentiviral vectors showed that K (the kinase domain only) and RCK (the kinase domain and the ROC-COR domain) harbouring the G2019S substitution had relatively low levels of phosphorylation activity, at least in our experimental conditions *in vitro*.  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup>, the largest fragment, containing the kinase, ROC-COR and WD40 domains, had relatively high levels of phosphorylation activity, which was significantly increased by the presence of the G2019S substitution. The higher kinase activity of the  $\Delta$ LRRK2 fragment than of the shorter fragments is consistent with the previous demonstration of a requirement of the ROC-COR domain for the G2019S mutation to cause an increase in the kinase activity of the full-length LRRK2 (Jaleel et al., 2007) and the amplification of this effect by the WD40 domain (Jorgensen et al., 2009). An intramolecular mechanism involving the GTPase domain seems to play a key role in regulating the catalytic activity of LRRK2 (Taymans et al., 2011; Xiong et al., 2010).

Our biochemical analyses to investigate whether  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> could phosphorylate the LRRK2 substrate RAB10 showed, in agreement with previous studies, that the N-terminus part of LRRK2 is required for the physical interaction between the two proteins. Even when the N-terminal part of LRRK2 is partly modified by simple amino acid substitution to block phosphorylation of S910 and S935, the binding to RAB10 is disrupted and the kinase is no longer able to phosphorylate RAB10 (Steger et al., 2017). As further discussed below,  $\Delta$ LRRK2 (WT or G2019S forms) is not expected to behave as the full length protein.

We then investigated whether the  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> fragment could induce a biological effect when expressed in neurons *in vivo*. Before assessing the potential toxic effects produced by  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> in the SNc neurons, a phenomenon that we assumed to require several months to be detected, we used a simple RT-qPCR array to determine whether  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> modified gene expression in neurons *in vivo* within a couple of weeks. This experiment was performed in the striatum since almost every neuron can be transduced around the site of injection in this brain region as previously shown (Francelle et al., 2015; Galvan et al., 2018), which would have been very difficult to achieve in the SNc. We found that  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> significantly modified the expression of neuronal genes with respect to the pattern of expression observed with the WT form and the catalytically inactive fragment  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup>. In contrast, the effects of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> were observed in the absence of hallmarks of neurodegeneration (no changes in caspase, Bim and Bcl2 mRNA levels, and no obvious cell loss). The genes with expression patterns modified by  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (and not  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup>) were all related to signalling/exocytosis and synaptic transmission. The  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>-induced reduction of neuronal genes – such as the SNAP25 gene coding for a synaptic protein and TAC1 which encodes preprotachykinin the precursor of Substance P – suggests that the LRRK2 mutation may induce an early alteration of the expression of genes related to synaptic functions in a kinase-dependent manner. Interestingly, a reduction in SNAP25 has been also reported in the brain of Lemurs infected with CAV2 to overexpress full length LRRK2<sup>G2019S</sup> (Mestre-Francés et al., 2018). Reduced levels of Substance P have been reported in the SNc and in the putamen in the brains of PD patients who had not received L-DOPA therapy (Tenovuo et al., 1984). The changes in gene expression we observed are intriguing and their precise consequences remain to be determined. This finding is consistent with the key role played by LRRK2 in the regulation of synaptic mechanisms (Parisiadou et al., 2014; Piccoli et al., 2011).

At the time point considered for behavioural and histological evaluation (25 weeks after infection), rats overexpressing  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> by LVs, displayed no major signs of neurotoxicity in the dopaminergic pathway *in vivo*. Counts of DA neurons in the SNc revealed no tendency towards neuronal loss in rats expressing  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>. In contrast, rats overexpressing  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> through the injection of an AAV vector displayed a 30 % neuronal loss as seen using not only TH immunocytochemistry but also immunocytochemistry of the dopaminergic marker VMAT, the vesicular transporter. We showed that at one month post-injection the protein expression level induced by AAVs was approximately 10 fold higher than that induced by LVs. These results suggested that in addition to the mutation, the level of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> expression in the few weeks after

injection was crucial to trigger a toxic effect. However,  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> did not produce toxicity, indicating that the G2019S-induced molecular change in the kinase domain (possibly related to an increase in the activity of its kinase) and not only a higher level of expression is required to trigger neurodegeneration in DA neurons. However, whereas it is probable that cell perturbations in DA neurons after expression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> may induce a kind of dysfunction, it did not lead to manifest motor dysfunctions. In rats expressing  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>, the chronic dysfunction of a relatively low proportion of the DA neurons in the SNc (~30%) may be compensated to hide major motor deficits. The nigrostriatal pathway is very “plastic” and capable of major compensatory mechanisms. For example, PD symptoms appear when more than 70% of the DA levels in the striatum are lost.

Our data are consistent with published results, including those from studies on G2019S knock-in mice where one copy of LRRK2 is expressed (Yue et al., 2015) and BAC-transgenic rats overexpressing LRRK2<sup>G2019S</sup> which have approximately 8 copies of the human gene (Lee et al., 2015). In these genetic models, no major loss of dopaminergic cells and no major motor deficits were observed, even in aged animals. This lack of effect may be due to the low level of LRRK2<sup>G2019S</sup> expression, close to endogenous levels, in these transgenic animals. In our experiments, the LRRK2 transgenes were much more strongly expressed after AAV transduction (about 25-50 copies per cell) (Ruiz and Déglon, 2012). Our results are, therefore, more directly comparable with those of three groups that generated viral models of LRRK2 overexpression based on the use of adeno- or herpes simplex viruses (Ad and HSV, respectively) encoding the full-length LRRK2 protein (Dusonchet et al., 2011; Lee et al., 2010; Mestre-Francés et al., 2018). In these models, LRRK2<sup>G2019S</sup> overexpression led to the partial degeneration of DA neurons in the SNc. These studies used viral vectors that underwent retrograde transport (which is not the case for the LVs and AAVs vectors used here), which means that neurons were transduced along with other cells in the striatum. It remains unclear whether the DA neuron degeneration induced by LRRK2<sup>G2019S</sup> in the adenovirus, HSV and CAV2 models results purely from cell-autonomous mechanisms. The medium-sized striatal GABAergic neurons, and neighbouring glial cells are probably also infected after striatal injections of adenovirus and HSV vectors. The neurodegeneration of SNc neurons in these two models may involve changes in both DA neurons and striatal cells. In our study,  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> was overexpressed only in DA neurons and we found a comparable DA neuron loss.

The LRRK2 fragments studied here are unlikely to be able to mimic all aspects of the biology of the full-length LRRK2, because they cannot interact with partners of the N-terminal domain of LRRK2. Our biochemical data confirmed that RAB10 is a substrate of full length LRRK2. This is coherent with recent work showing that in the SN DA neurons of both idiopathic PD patients and rat models (rotenone-based model and human  $\alpha$ -synuclein overexpression in the SNc via AAV2) there is an increase of LRRK2 kinase activity. This event might lead to phosphorylation of RAB10 substrate, followed by impairment of lysosomal and mitochondrial functions (Di Maio et al., 2018). Here we showed that  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> cannot increase the level of phosphorylation of RAB10, underscoring that  $\Delta$ LRRK2, despite its phospho-transferase catalytic activity, cannot interact with all partners of the full length LRRK2. Although RAB10 may be a key molecular player in PD, it cannot be excluded that other parallel mechanisms also contribute to mutant LRRK2-related toxicity. Substrates exist that do not require the N-terminus of LRRK2 for interaction with the kinase. Especially, the C-terminal WD40 domain is thought to be a key molecular player for the interaction of LRRK2 with different partners. For example, the WD40 domain allows LRRK2 to bind synaptic vesicles and to phosphorylate synapsin I (Marte et al., 2019; Piccoli et al., 2014). WD40 may also be involved in the interaction of LRRK2 with microtubules (Kett et al., 2012). Thus it is conceivable that  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> may trigger neurodegeneration, despite the absence of the N-terminal domain of LRRK2.  $\Delta$ LRRK2 fragments provide an interesting tool for the precise evaluation *in vivo*, and more specifically in neurons, of the role of the kinase and neighbouring domains, namely the ROC-COR GTPase domain and the WD40 domain. The requirement of the ROC-COR domain for the G2019S mutation to cause an increase in the kinase activity of the full-length LRRK2 has been shown (Jaleel et al., 2007). An intramolecular mechanism involving the GTPase domain seems to play a key role in regulating the catalytic activity of LRRK2 (Taymans et al., 2011; Xiong et al., 2010). In addition, there is an amplification of this effect by the WD40 domain (Jorgensen et al., 2009). It is tempting to speculate that the differential effects between the wild type and G2019S forms of  $\Delta$ LRRK2 in our experiments partly result from a change in

the activity of the kinase, although this awaits further *in vivo* studies with pharmacological LRRK2 inhibitors and dead kinase mutants to be fully supported.

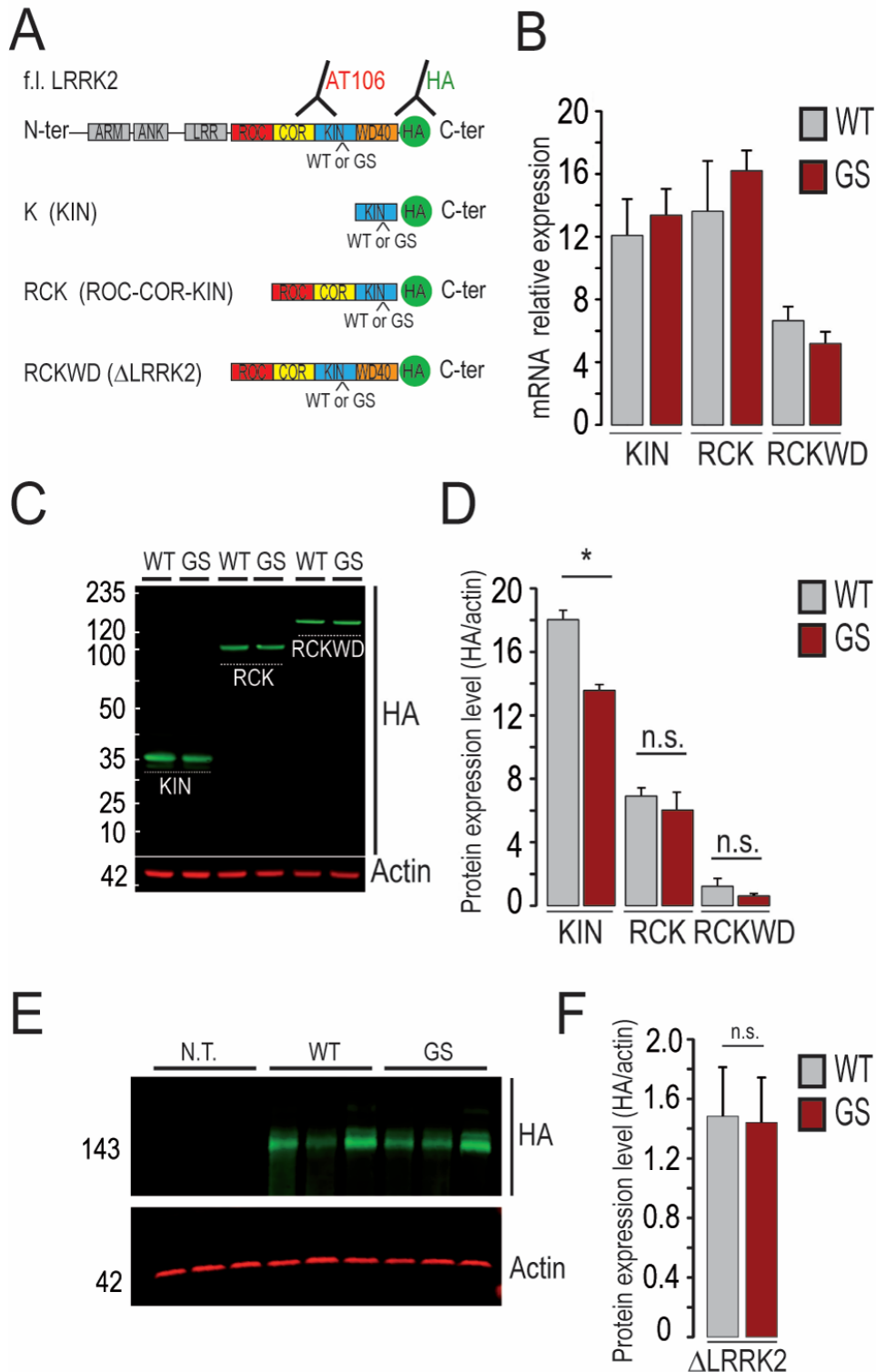
The  $\Delta$ LRRK2 constructs are also versatile tools for studying the effects of increases in the kinase activity of LRRK2<sup>G2019S</sup> in different brain cells. For example, driving  $\Delta$ LRRK2 expression with the GFAP promoter might be an interesting approach for studying the selective role of LRRK2's (WT and G2019S) kinase domain in astrocytes (Colin et al., 2009). These C-terminal fragments could also be used to investigate the selective role of the physiological kinase activity of LRRK2 in other types of neurons, such as striatal GABAergic neurons, in which levels of LRRK2 expression are naturally higher than in other brain regions.

LRRK2 has also been shown to interact physically or genetically with several other important proteins involved in PD. Potential "functional" interactors of LRRK2 include the  $\alpha$ -synuclein protein (Cresto et al., 2019; Lin et al., 2009). The exact role of the kinase domain in this important interaction should be further studied. The use of truncated LRRK2 proteins such as  $\Delta$ LRRK2 we used in the present study, in comparison with the full length LRRK2, could be of interest to address the existence of this functional LRRK2/ $\alpha$ -synuclein interaction specifically in DA neurons or other cell types.

## Conclusion

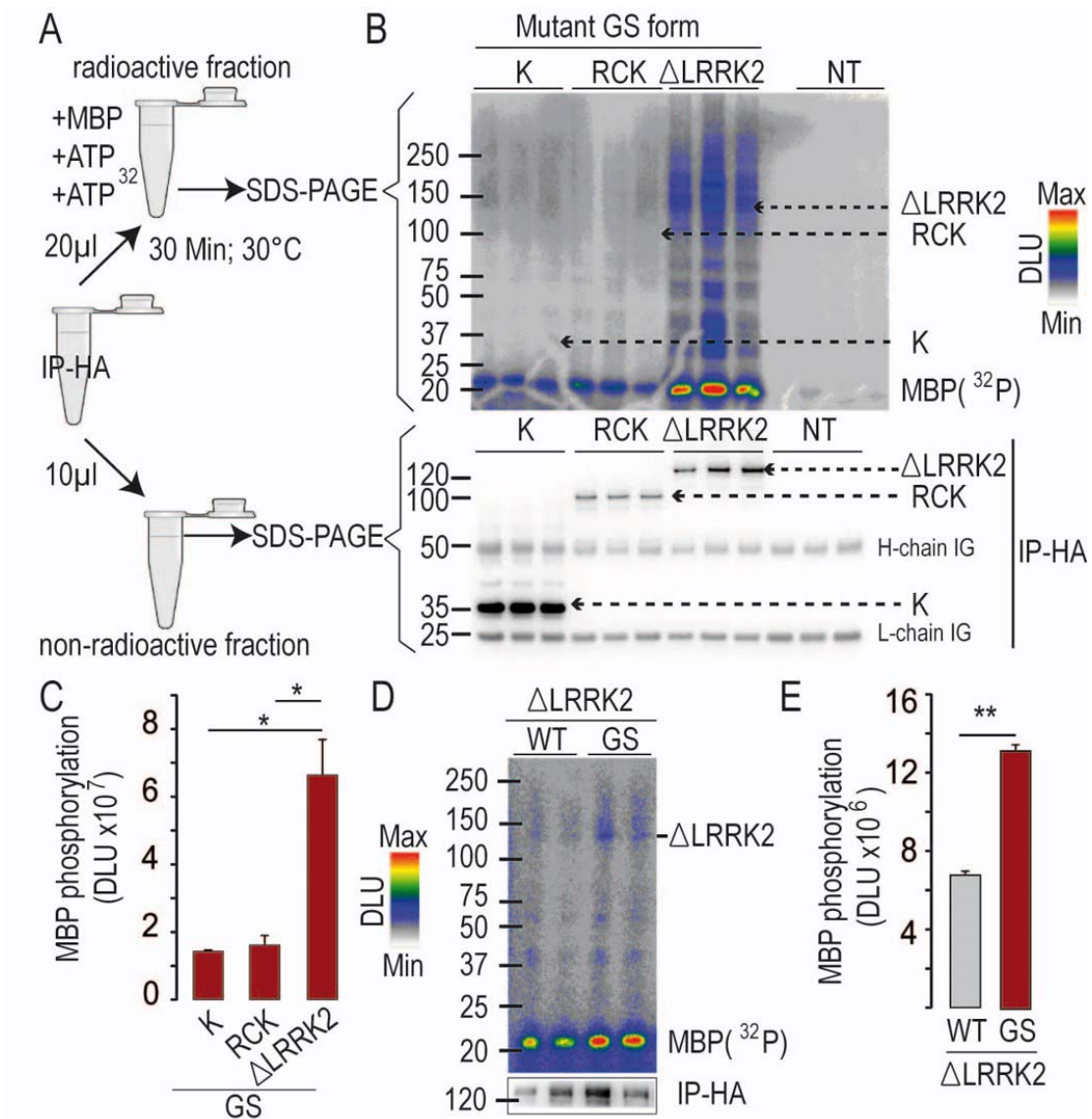
In conclusion, we present a novel molecular tool for studying the effects of the C-terminal part of LRRK2 in neurons, *in vivo*. Our results indicate that a selectively high expression in DA neurons of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> is sufficient to induce DA neuronal loss within an experiment time frame of 6 months. These results suggest that both the expression level and the G2019S substitution-induced increase in kinase activity of the overexpressed LRRK2 fragment may be key factors to trigger cell death pathways in animal models.

Figures



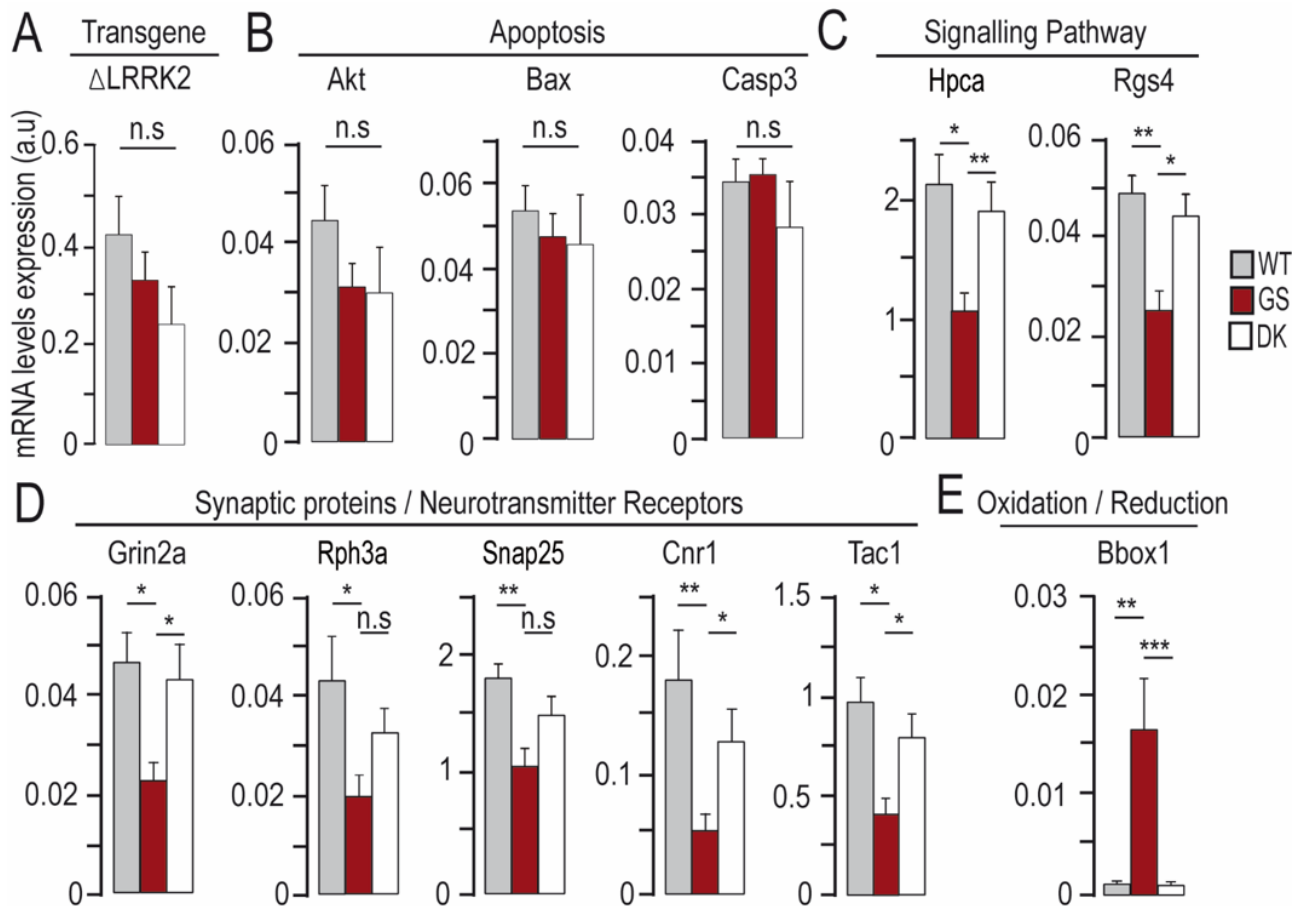
**Figure 1: Characterization of the expression of LRRK2 constructs *in vitro* in cell lines.** (A) Plasmids coding for the full length (FL), kinase domain (K), the ROC/COR GTPase domain (RCK), and the RCK with the WD40 domain (RCKWD40, i.e.  $\Delta$ LRRK2) with the addition of a hemagglutinin tag (HA) were synthesized in the WT or G2019S forms. (B) Quantitative analysis of the results from RT-qPCR on mRNA extracts after transfection of HEK293T cells with plasmids coding the different forms shown in A. (C) Western blot analysis after SDS-PAGE showed that the six different fragments migrated at their expected molecular weights when detected with the anti-HA antibody. (D) Quantification of the western blots shown in C. (E) Western blot analysis after SDS-PAGE of protein extracts obtained from three independent transfections with plasmids coding either WT or GS forms

of  $\Delta$ LRRK2. (F) Quantification of the western blots shown in E. \*,  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ , Student's  $t$  test for paired comparison.

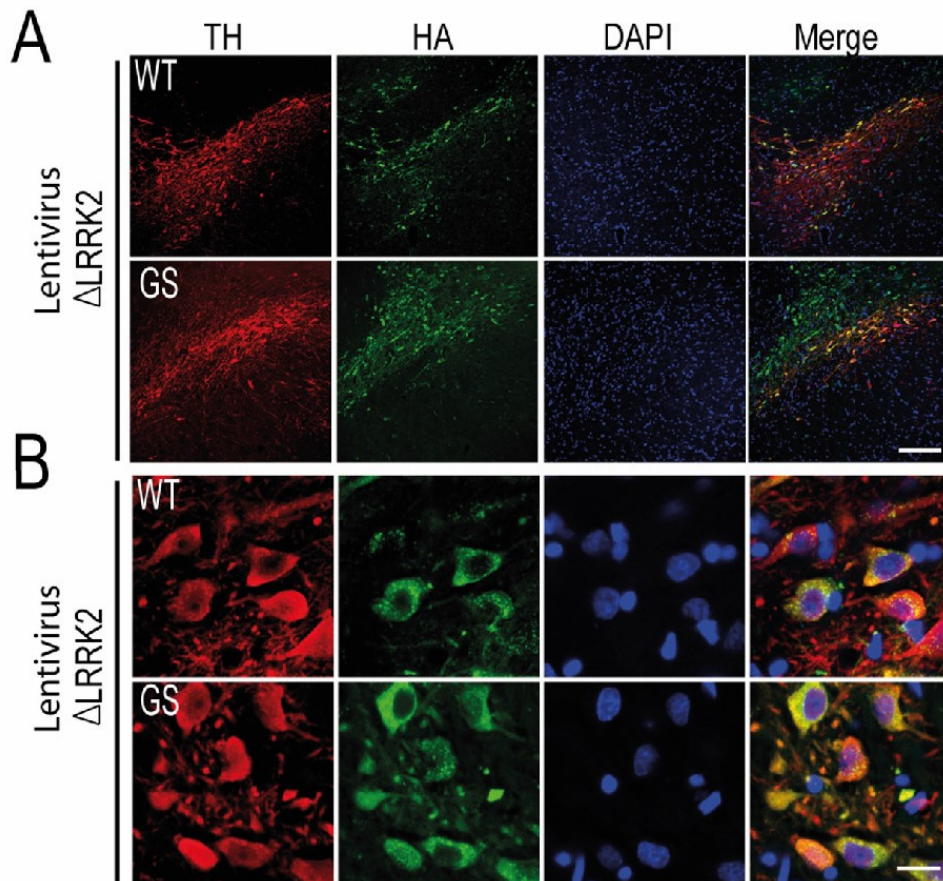


**Figure 2: Biochemical characterization of the C-terminal fragments of LRRK2.** Kinase assay: Fragments were purified by HA-mediated immunoprecipitation. A portion of the magnetic beads was used to study the levels of recombinant fragments by western blotting (IP-HA). The rest of the beads were incubated with radioactive  $^{32}$ P-ATP and myelin basic protein (MBP) as a kinase substrate (A). After incubation, K (kinase domain), RCK (ROC-COR-kinase) and  $\Delta$ LRRK2 (ROC-COR-kinase-WD40 domain) and MBP were separated by SDS-PAGE, and  $^{32}$ P-labelled proteins were detected with a PhosphorImager. (B) Representative image showing  $^{32}$ P-incorporation into MBP after incubation with each of the three fragments carrying the G2019S mutation (GS). (D)  $^{32}$ P-incorporation into MBP after incubation in the presence of wild-type (WT)  $\Delta$ LRRK2, relative to incorporation in the presence of  $\Delta$ LRRK2 carrying the G2019S (GS) mutation. (C, E). Quantification of  $^{32}$ P-incorporation into MBP. \*,  $p < 0.05$ ; One-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. \*\*,  $p < 0.01$ , or Student's  $t$  test for paired comparison.

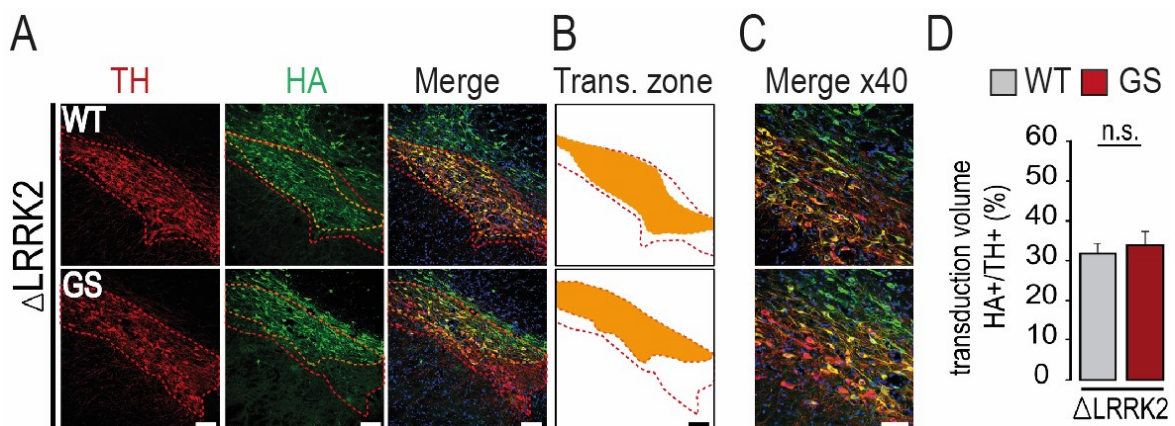




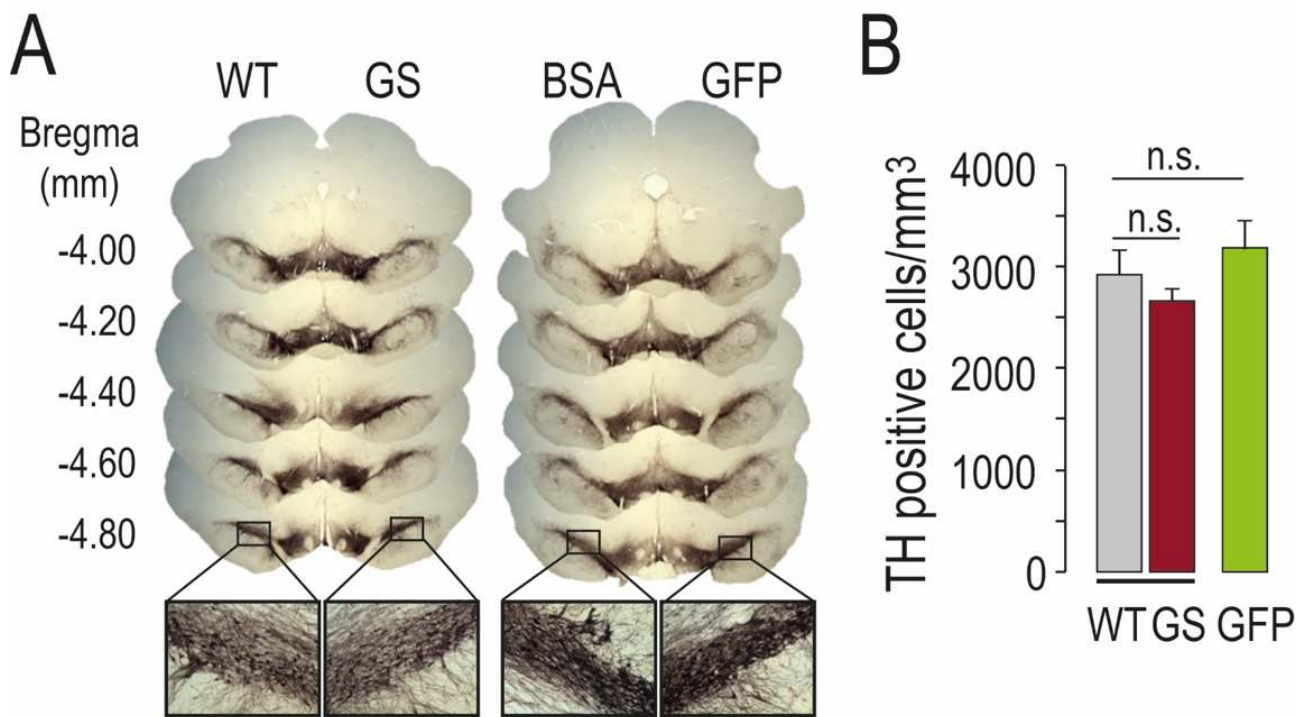
**Figure 3: Biological effects of  $\Delta$ LRRK2 fragments in the striatum assessed using a RT-qPCR array.** Rats received intra-striatal co-injections of LV- $\Delta$ LRRK2 [WT, G2019S or the dead kinase (DK: G2019S + D1994A) forms (100 ng/ $\mu$ l)] with LV-GFP (50 ng/ $\mu$ l) and the levels of 84 different mRNA species were measured with an RT-qPCR array at 6 weeks post-infection. (A) The levels of mRNA for each LRRK2 fragment (Transgene) were measured by RT-qPCR. (B) No major change in the expression of the apoptosis-related genes on the array was induced by  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> overexpression (Akt, Bax and Casp3). (C-E) Gene products (of the 84 on the array – see the materials and methods section) with a different level of expression in the group injected with LV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> than in the other groups, including (C) signalling pathway genes (HPCA, hippocalcin; RGS4, regulator of G protein signalling 4), (D) synaptic proteins and neurotransmission genes (Grin2a, NMDA receptor subunit A; Rph3a, rabphilin 3a; SNAP25, synaptosomal-associated protein 25; Cnr1, cannabinoid receptor 1; Tac1, preprotachykinin/substance P) and (E) oxidation/reduction pathway (Bbox1, gamma-butyrobetaine dioxygenase). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis, ANOVA and Mann-Whitney tests ( $n = 6$ /group).



**Figure 4:** Expression of  $\Delta$ LRRK2 fragments at the cellular level ten weeks after infection of the SNc with AAV- $\Delta$ LRRK2. Double-immunofluorescence labelling and confocal microscopy were used to study  $\Delta$ LRRK2-HA expression in transduced SNc at 10 weeks post-infection with AAV2/9- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> or AAV2/9- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (HA-positive, green). Representative images at low (A) or high (B) magnification are shown. Note that dopaminergic cells (TH-positive, red) in SNc co-localize with  $\Delta$ LRRK2 (HA-positive/TH-positive, green) (B). Scale bars in A and B: 400  $\mu$ m and 10  $\mu$ m respectively.

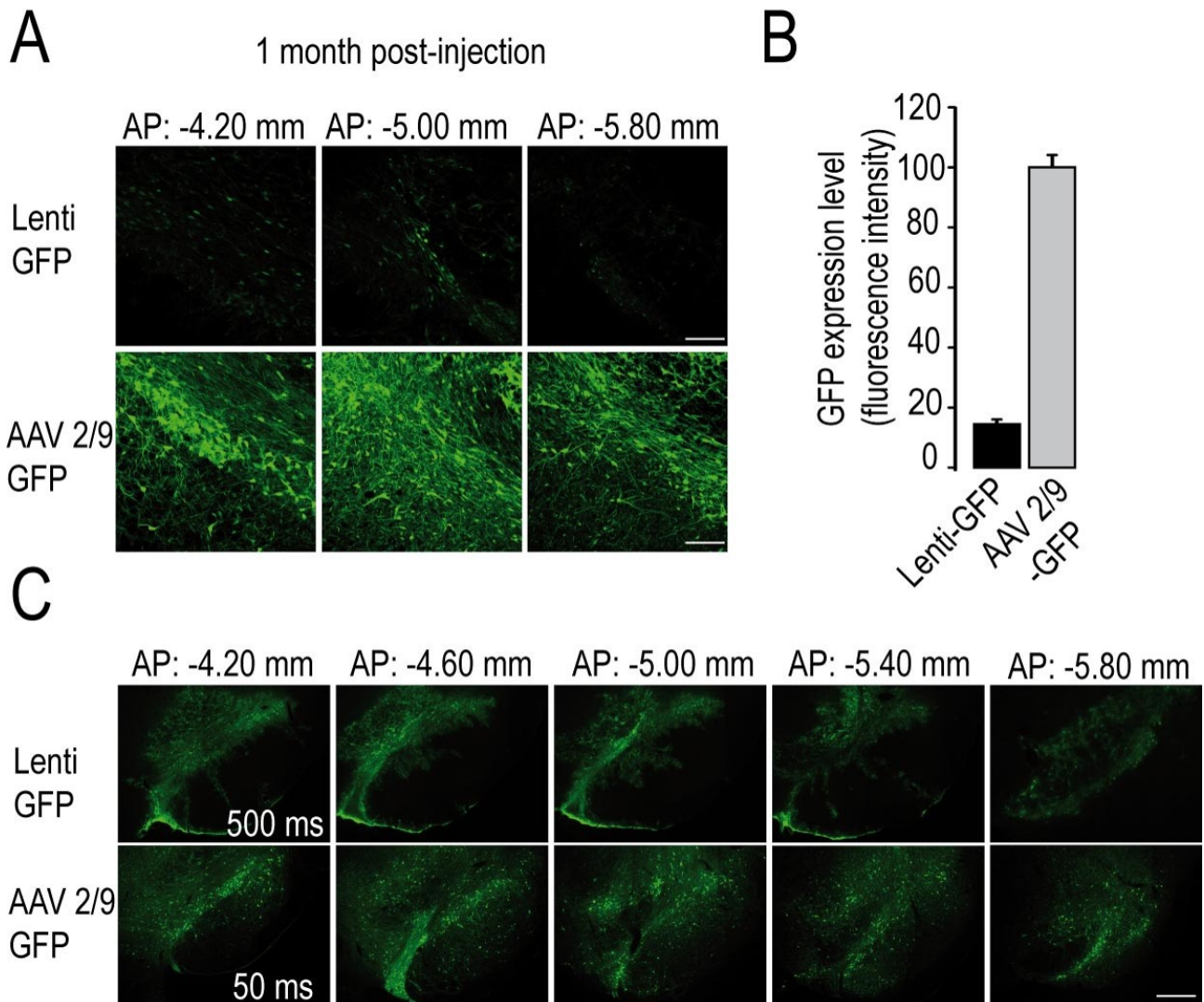


**Figure 5:** Quantification of the expression of  $\Delta$ LRRK2 in the SNc ten weeks after LV injection. (A) Double-immunofluorescence labelling and confocal microscopy were used to determine the volume of the SNc (TH-positive, red) at 10 weeks post infection with LV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> or LV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (HA-positive, green). The TH-positive (in red) and HA-positive (in green) zones were delineated and mapped onto the merged acquisition for delimitation of the co-infected area (HA-positive/TH-positive) (B). (C) Higher magnification showing SNc neurons co-expressing TH and LRRK2 fragments. (D) Quantification was performed along the rostro-caudal extension of the total SNc to calculate, using the Cavalieri method, the volume of transduction with regard to the volume of the SNc.  $n=6-7$ / group; unpaired Student's  $t$  test; n.s.: non-significant. Scale bars: 200  $\mu$ m.

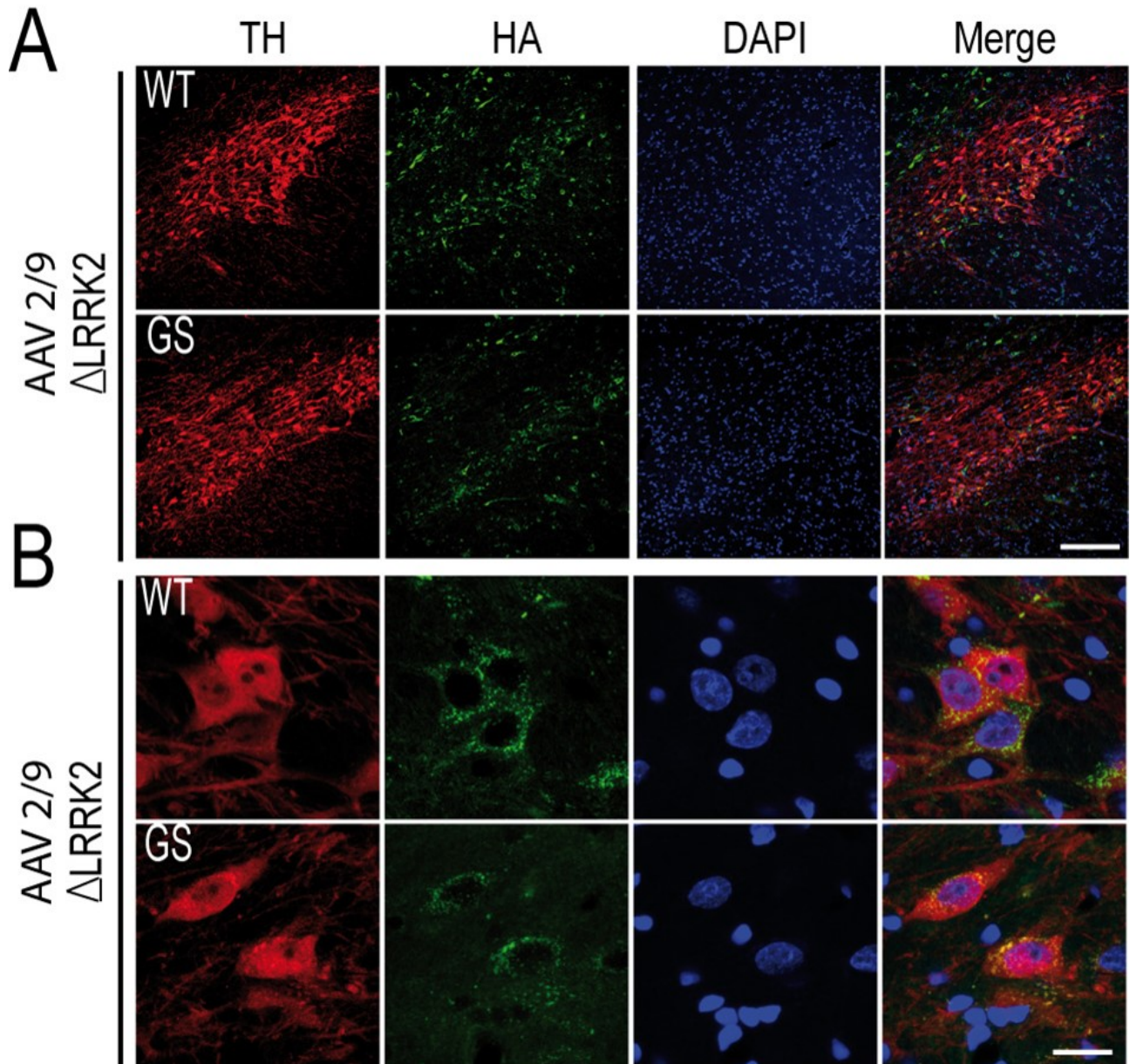


**Figure 6: Histological evaluation of the effects of wild-type and G2019S LV- $\Delta$ LRRK2 in the SNc, 25 weeks after injection.** Lentiviral vectors encoding the  $\Delta$ LRRK2 fragment or GFP as a control were injected into the SNc. (A) Representative histological sections of the SNc at different antero-posterior levels after immunohistochemical staining of tyrosine hydroxylase (TH). Note that TH immunohistochemistry indicates an absence of major toxicity for  $\Delta$ LRRK2 in the SNc even when observed at higher magnification (bottom images). (B) The number of TH-positive neurons was counted in the part of the SNc into which the injections were made. Two-way ANOVA was used for between-group comparison;  $n=5$ /group.





**Figure 7: Comparison between AAV and lentiviral transduction.** (A) Direct GFP expression was evaluated by confocal microscopy one month post-injection of LVs or AAVs coding for the GFP protein. Acquisitions were made in three different levels of the SNc with the same confocal parameters between LV and AAV. Scale bar: 400  $\mu$ m. (B) The quantification represents the mean fluorescence intensity. (C) Direct GFP expression was also evaluated by epifluorescence microscopy at low magnification. Note that for the same apparent fluorescence intensity, the time of illumination was 10 fold higher for LV-mediated transduction in comparison with AAV.  $n= 6$  animal/group. AP: antero-posterior from Bregma. Unpaired Student's  $t$  test for comparison; n.s.: non-significant. Scale bar: 500  $\mu$ m.



**Figure 8: Immunofluorescence analysis of *in vivo* expression of  $\Delta$ LRRK2 ten weeks after infection with AAV2/9 in the SNc.** (A) Double-immunofluorescence labelling and confocal microscopy were used to evaluate the specificity of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> for DA neurons in the SNc at 10 weeks P.I.. (B) Higher magnification showing SNc neurons co-expressing TH and  $\Delta$ LRRK2 fragments. Note that the expression of the HA tag in the SNc is not markedly different in the presence of the G2019S substitution and in the presence of the wild-type (WT) form. Scale bar: 400  $\mu$ m in A and 10  $\mu$ m in B.



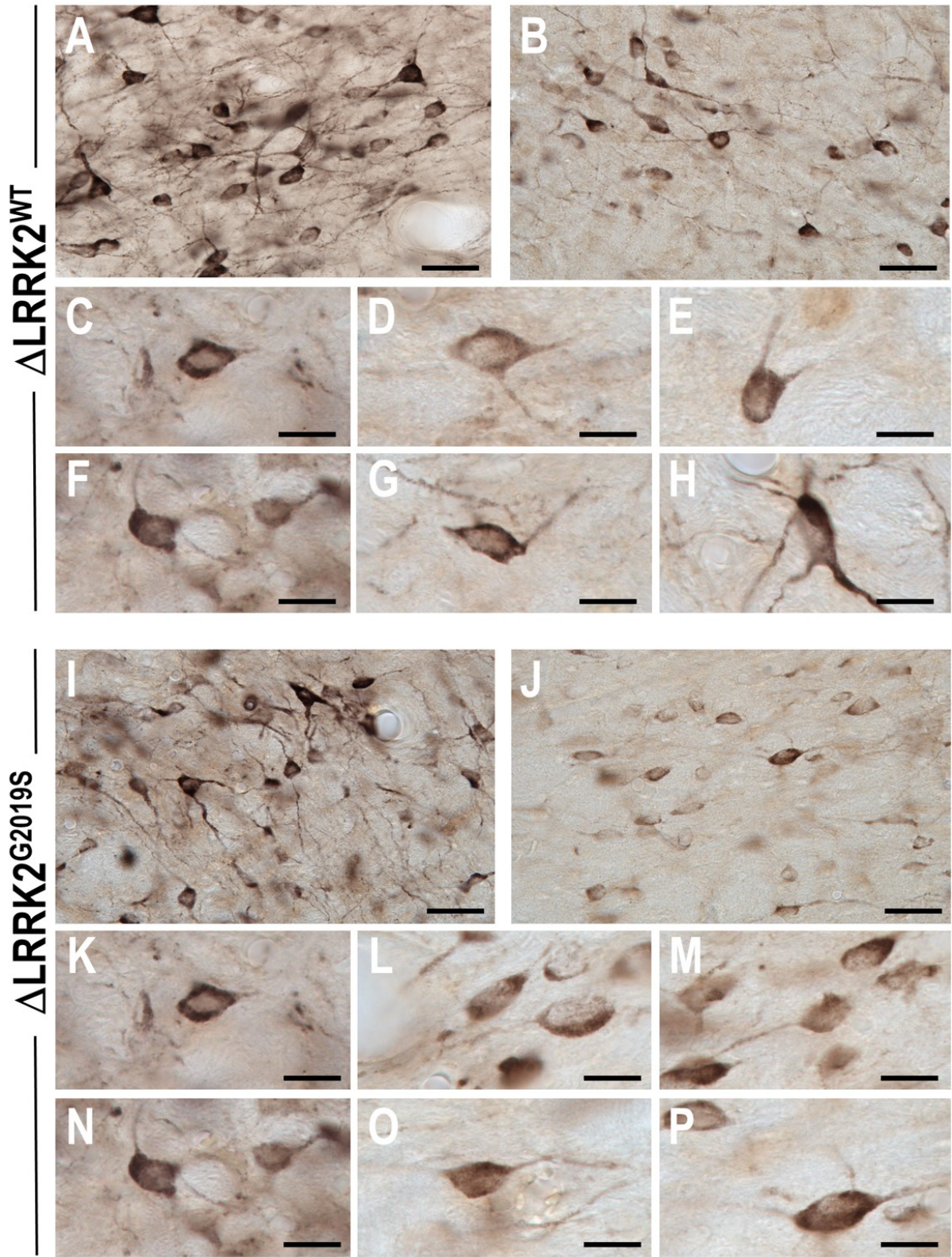
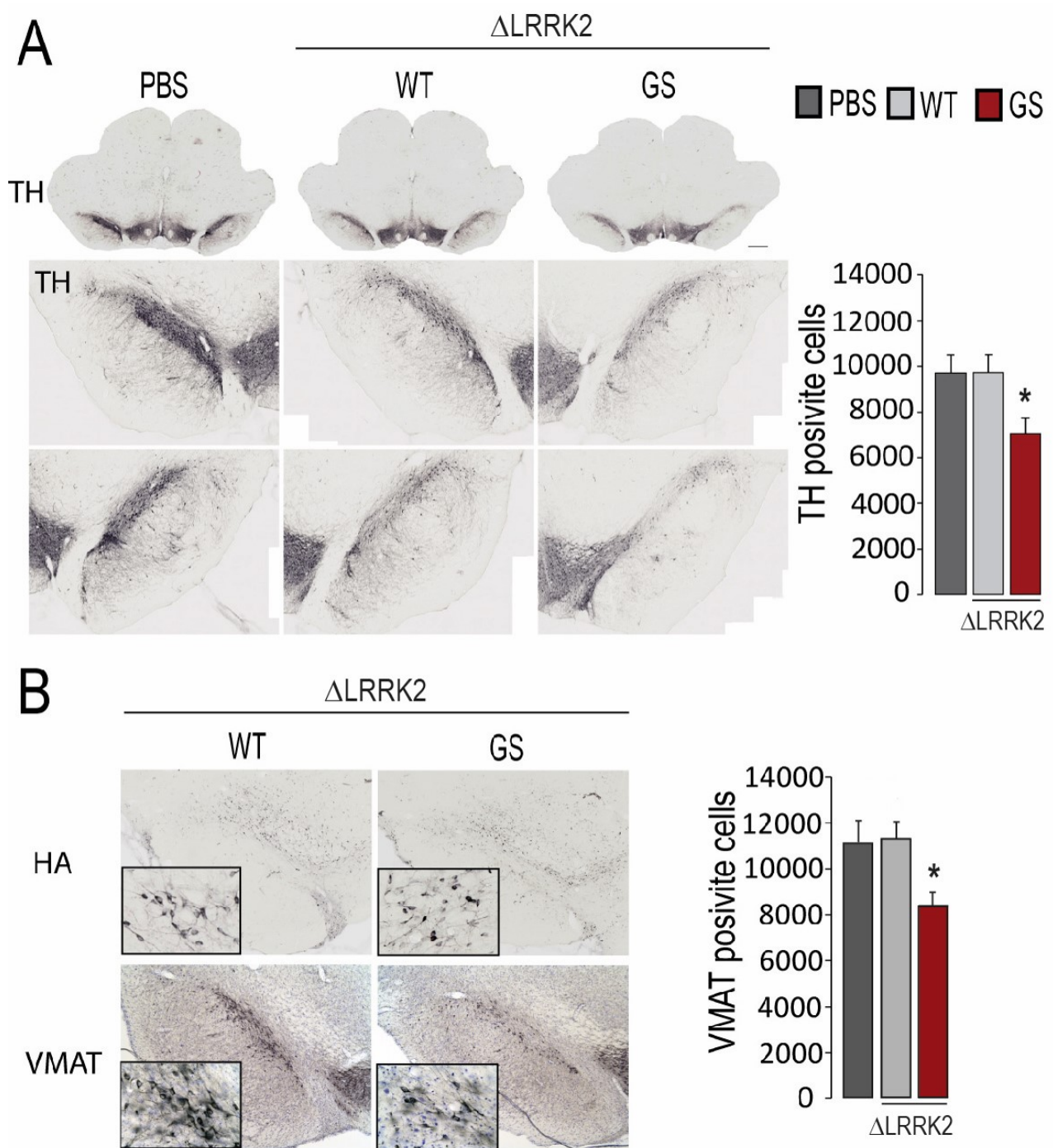


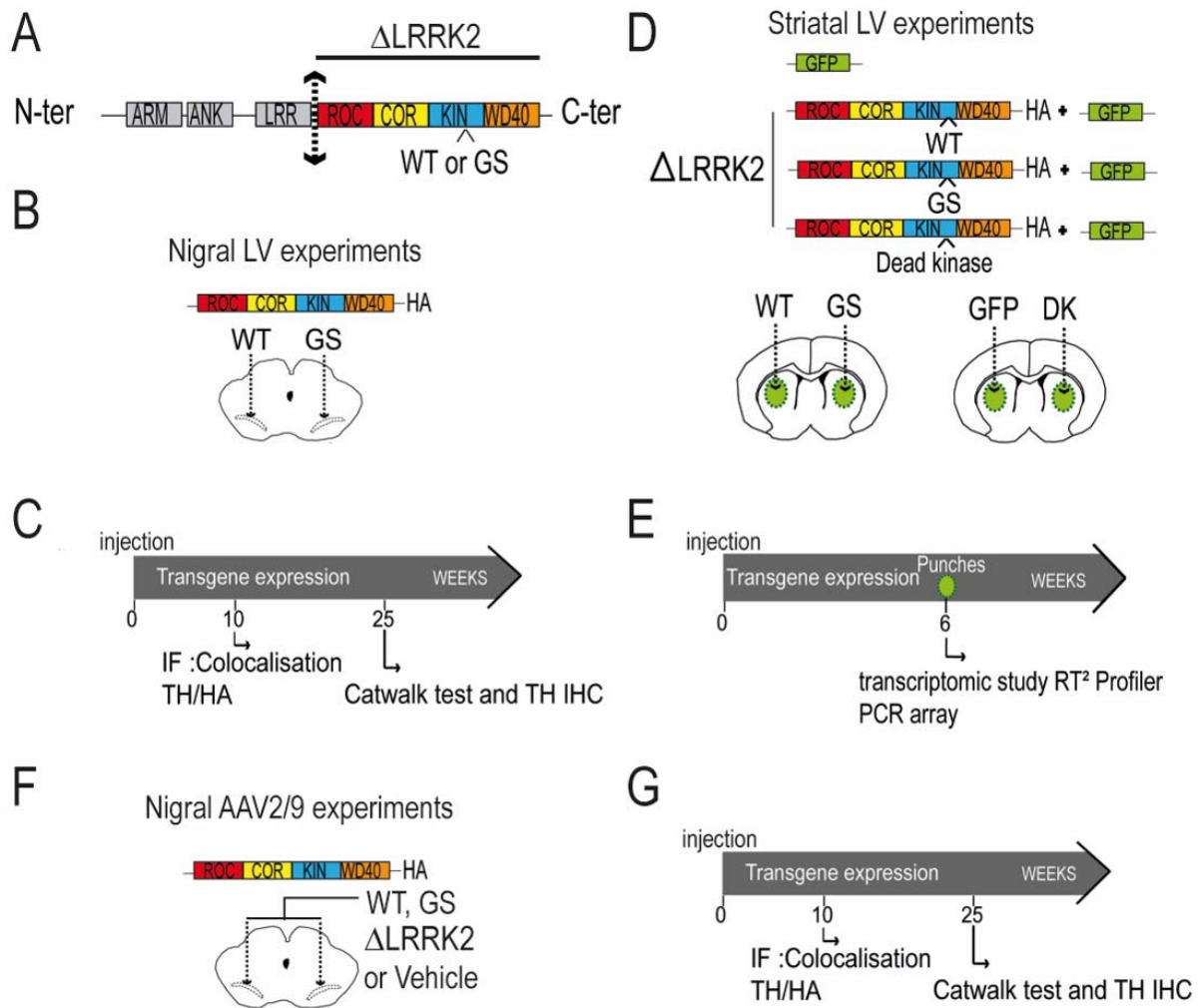
Figure 9: Immunohistochemical analysis of the expression of  $\Delta$ LRRK2 twenty five weeks after infection with AAV2/9 in the rat SNc. Photomicrographs of neurons labelled by HA-tagged  $\Delta$ LRRK2 immunohistochemistry at 25 weeks post-infection in rats injected with either AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> (A-H) or AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (I-P). Exposition time was set to allow light to go through labelled neurons in order to detect the potential presence of punctuate staining. Some neurons show moderate (A, I) to weak (B, J) staining. Note that the staining is relatively diffuse throughout the cytoplasm. Scale bar: 50  $\mu$ m in A, B, I, J. and 10  $\mu$ m in other fields of view.



**Figure 10: Histological evaluation of the effects of wild-type and G2019S AAV- $\Delta$ LRRK2 in the SNc at 25 weeks post-injection.** AAVs encoding the  $\Delta$ LRRK2 fragments or PBS as a control were injected bilaterally into the SNc. (A) Tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry was performed in the SNc to evaluate the toxicity. The number of TH-positive neurons was evaluated by stereology in the entire SNc. (B) Vesicular Monoamine Transporter (VMAT2) immunochemistry was performed in the SNc and the number of VMAT-positive neurons was assessed by stereology in the entire SNc. One-way ANOVA was used for between-group comparison and Bonferroni *post hoc* correction for multiple comparisons was applied ;  $n=9/$  group; \*,  $p<0.01$ . Scale bar: 750  $\mu$ m.



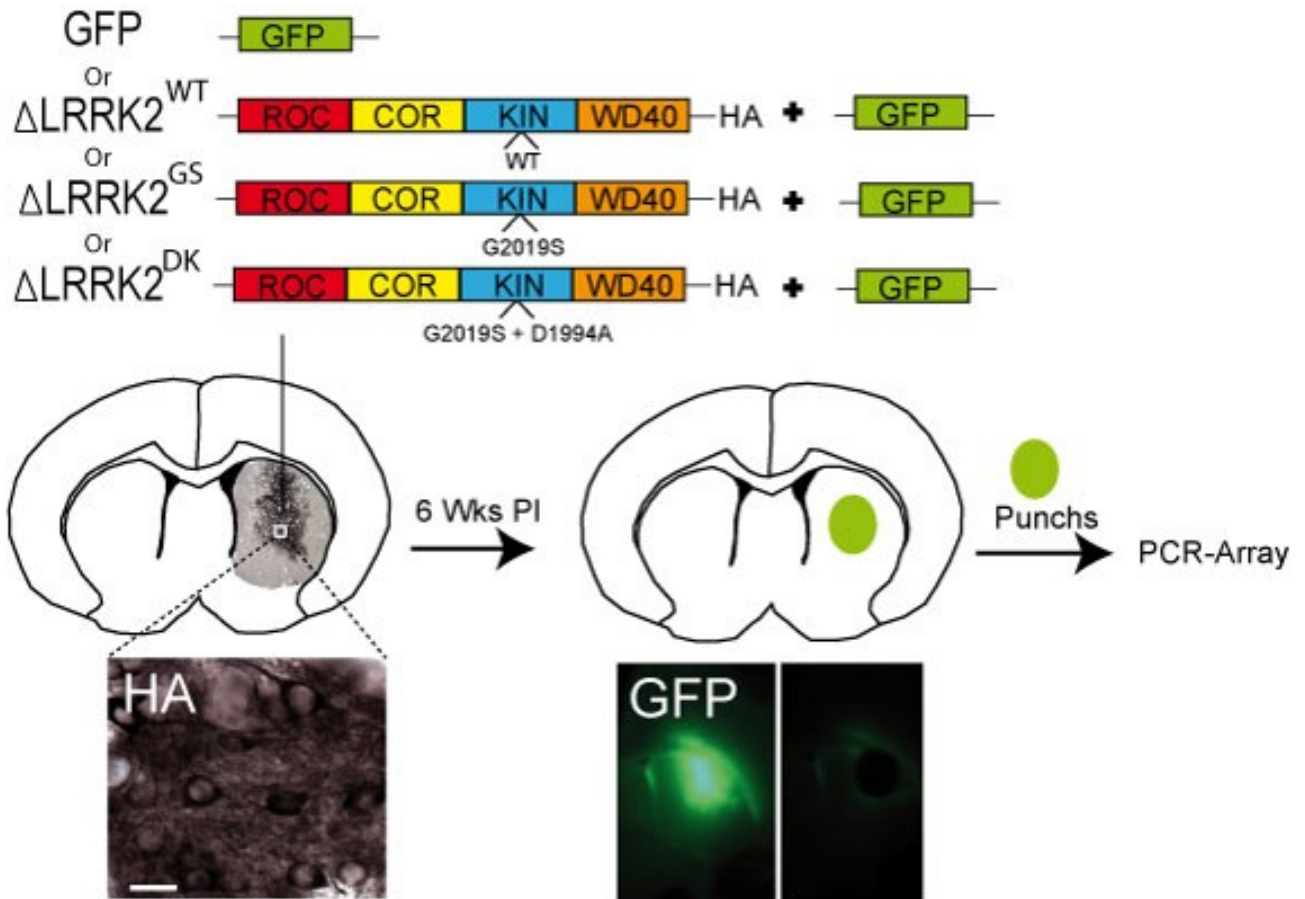
Supplementary figures



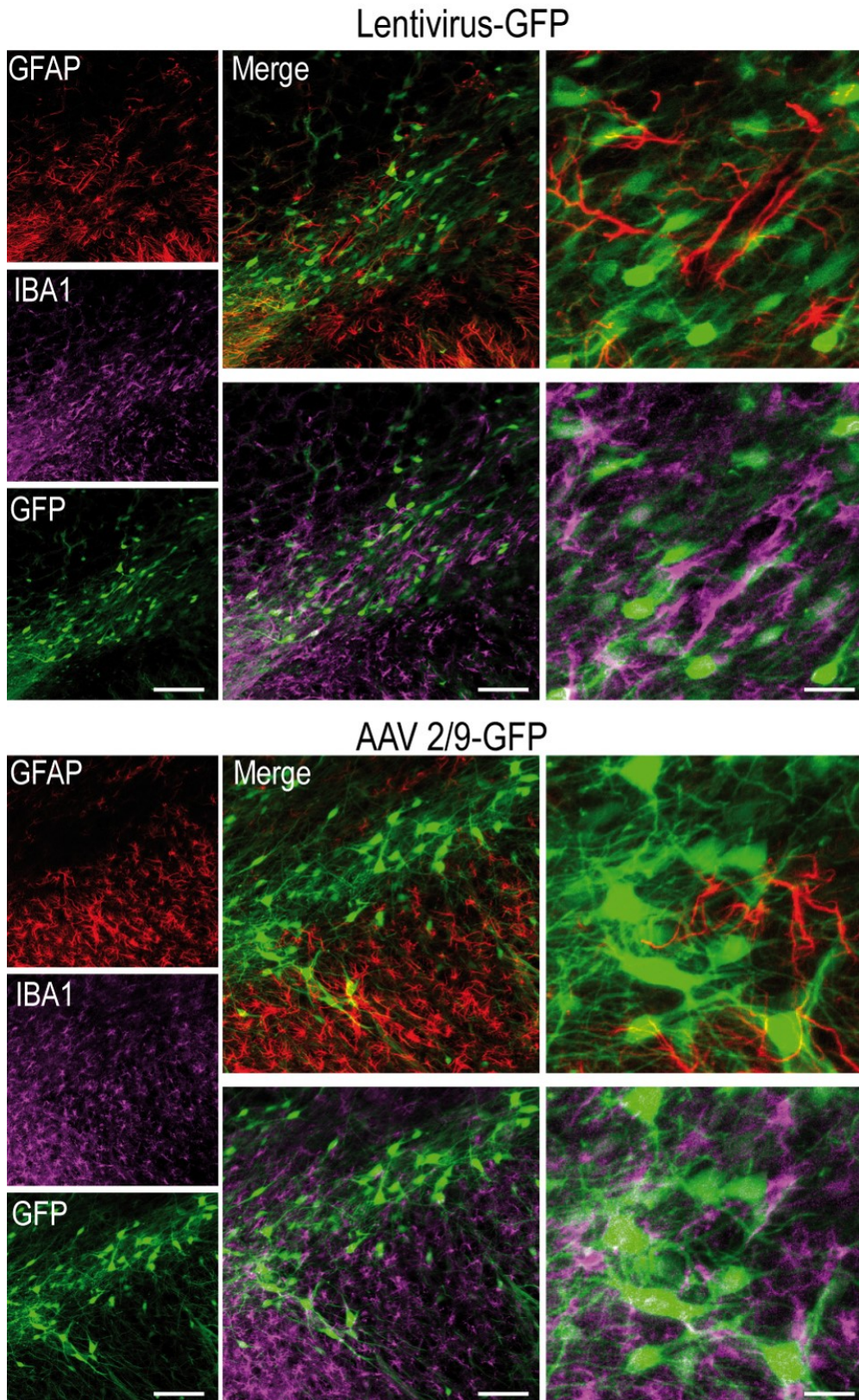
**Supplementary Figure S1: Experimental design of *in vivo* experiments in adult rats.** (A) The potential toxicity of different LRRK2 fragments containing the kinase domain was studied *in vivo* by generating lentiviruses (LV) and Adeno-Associated Virus (AAV) encoding the C-terminal domains of LRRK2 ( $\Delta$ LRRK2), either wild-type (WT), or with the G2019S mutation. (B) Adult rats received bilateral stereotaxic injections in the SNc of LVs encoding WT  $\Delta$ LRRK2 in the left hemisphere, and the G2019S form (GS) in the right hemisphere. As a control, rats received a LV encoding GFP or an injection of BSA. (C) Potential effects of LVs on motor performance and DA neuron survival was assessed. At 10 weeks post-injection (P.I.), the histological evaluation by immunofluorescence focused on the co-localisation of the transgene products with a HA antibody and DA neurons labelled with a tyrosine hydroxylase antibody (TH). At 25 weeks P.I., rats were subjected to a motor test (CatWalk) and *post mortem* histological evaluation. (D) For the striatal experiment aiming at detecting cellular perturbation produced by  $\Delta$ LRRK2, rats received bilateral injections of LVs encoding  $\Delta$ LRRK2 into the striatum mixed with LV-GFP. (E) Six weeks after injection, the GFP-positive area in the striatum was dissected out for RT-qPCR array analysis (see Supplementary Fig. S3). (F) Groups of rats received bilateral stereotaxic injections of AAVs in the SNc. AAVs encoded either,  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> or  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>. As control, rats received an AAV encoding GFP or an injection of the vehicle (PBS/pluronic acid). (G) Potential effects of AAVs on motor performance and DA neuron survival were studied. At 10 weeks P.I., the histological evaluation by immunohistochemistry and immunofluorescence were carried out. At 25 weeks P.I., rats were subjected to a motor test (CatWalk) and histological evaluation, including unbiased stereological counts of TH and VMAT2 positive neurons in the SNc.





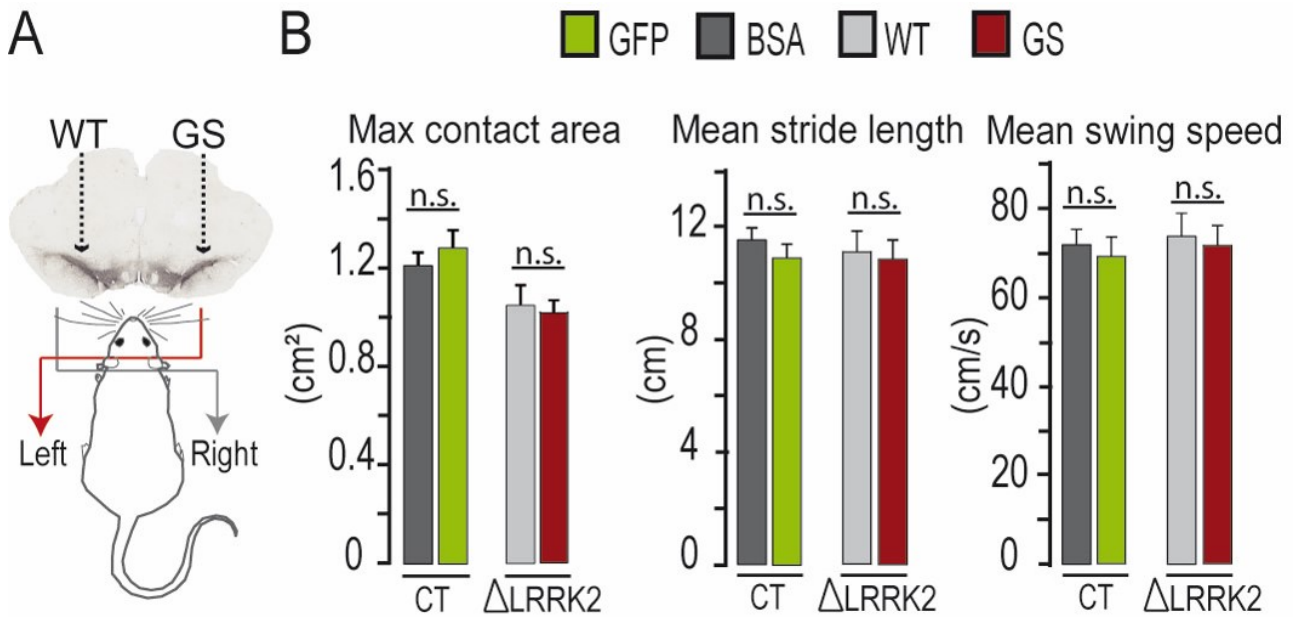


Supplementary Figure S3: Transcriptomic analysis of LRRK2 fragments *in vivo*. LVs- $\Delta$ LRRK2 (WT, G2019S or G2019S/D1994A) and LVs-GFP were co-injected in the striatum. The striatal region displaying GFP fluorescence was dissected under a fluorescence binocular microscope (Leica). The punch samples were then processed for RT-qPCR.

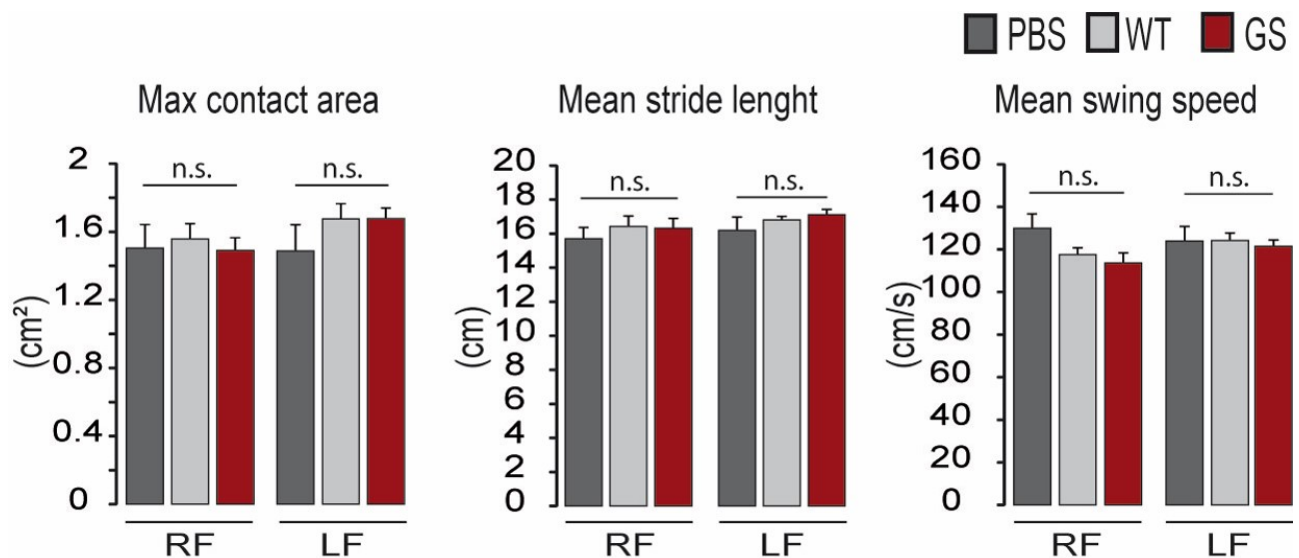


**Supplementary Figure S4: Preferential expression of transgenes in neurons after infection with lentiviral vectors and AAV2/9.** LV-GFP or AAV-GFP were injected in the SNc. Histological evaluation was performed 4 weeks post-infection. Double immunofluorescence labelling for GFAP (astrocytes) and IBA1 (microglia) was used to evaluate the specificity of LVs and AAVs for neurons compared to other cell types (scale bar = 400 $\mu$ m and 10 $\mu$ m for the magnifications). No expression was seen in astrocytes or microglial cells. Similar results were obtained in groups of 3 animals for each vector.





**Supplementary Figure S5: Motor performance of rats receiving injections of LV coding for WT or G2019S  $\Delta$ LRRK2 and GFP in the SNc, measured 25 weeks after injection.** The gait of the rats was evaluated in the Catwalk apparatus. We analysed the right forelimb, corresponding to the contralateral SNc infected with a LV encoding wild type (WT) LRRK2 fragments (in light grey), and the left forelimb, corresponding to the right SNc infected with LVs encoding G2019S forms (in red), separately (A). Three parameters are presented: maximal (max) contact area (B), mean stride length (C) and mean swing speed (D). Two-way ANOVA for between-group comparison ( $n=12$ /group), n.s. (non-significant).



**Supplementary Figure S6: Motor performance of rats receiving injections of PBS or AAV coding for WT or G2019S  $\Delta$ LRRK2 or in the SNc, measured 25 weeks after injection.** The gait of the rats was evaluated in the Catwalk apparatus for the three different groups. We analysed the right forelimb (RF) and the left forelimb (LF). Three parameters are presented: maximal (max) contact area, mean stride length and mean swing speed. One-way ANOVA for between-group comparison ( $n=12$ /group), n.s. (non-significant).

## Supplementary Table 1

Primer sequences	
$\Delta$ LRRK2	RnWD40-F TCAGCGTTCAGCGATTCTAACAT RnWD40-R CTTCTTGTCACACCTCTACGA
Hpca	RnHpca_1F CCGGGAGTTCATCATCGCTCT RnHpca_2R CCATTGCCGTCCAGGTCGTA
Rgs4	RnRgs4_1F TTCTCTCCTCGCTCCGAATCC RnRgs4_2R GCAGAAATCCCAGCCGATGTT
Grin2a	RnGrin2a_1F ACAGGGACCCTAAGTGGCGAC RnGrin2a_2R CCAGCAGCACCCGAATG
Rph3a	RnRph3a_1F GGGCTCTGCGTGTGTCGTGT RnRph3a_2R ACTGGATGCGGACGGTTGTTG
Snap25	RnSnap25_1F TCCGCAGGGTAACAAACGATG RnSnap25_2R TCCGATGATGCCGCTCAC
Cnr1	RnCnr1-1F AGTCACCTTGAGTCTGGCCTAATC RnCnr1-2R GTCATTGAGCCACGTTAGAG
Tac1	RnTac1-1F TCAACTGTTTGCAGAGGAAATCGG RnTac1-2R GCTGAGGCTTGGGTCTTCGG
Bbox	RnBbox1-3F TCAGCTTCCACACAGATTACCCA RnBbox1-4R GCACACATTAACCCATCTACGA

Table 1: In house designed primer sequences used for double checking the results of the RT-qPCR analysis. The primers of the “Huntington's Disease” RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen) are proprietary. List can be found at <https://www.qiagen.com/be/shop/genes-and-pathways/complete-biology-list/huntingtons-disease/>

### Acknowledgements

This work was funded by rolling grants from the CEA and the CNRS.

The research generating these results received funding from la Fondation de France (AAP 2010-2011 and 2013, Engt 00016819). Noémie Cresto is a recipient of a PhD fellowship from Association France Parkinson (2016). The studies were also funded by European Union Horizon 2020 Programme (H2020-MSCA-ITN-2015) under the Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Networks and Grant Agreement No. 676408.

This work benefited from a support from the national “Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences” (NeurATRIS, “Investissement d'Avenir”, ANR-11-INBS-0011).

### Conflict of Interest Statement

All authors declare that they have no conflict of interest

### References

Aufschnaiter, A., Kohler, V., Walter, C., and Tosal-castano, S. (2018). The Enzymatic Core of the Parkinson's Disease-Associated Protein LRRK2 Impairs Mitochondrial Biogenesis in Aging Yeast. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–15.

Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., et al. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-

associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods* 23, 18–28.

Beccano-Kelly, D.A., Kuhlmann, N., Tatarnikov, I., Volta, M., Munsie, L.N., Chou, P., Cao, L.-P., Han, H., Tapia, L., Farrer, M.J., et al. (2014). Synaptic function is modulated by LRRK2 and glutamate release is increased in cortical neurons of G2019S LRRK2 knock-in mice. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

Berger, A., Lorain, S., Joséphine, C., Desrosiers, M., Peccate, C., Voit, T., Garcia, L., Sahel, J.-A., and Bemelmans, A.-P. (2015). Repair of Rhodopsin mRNA by Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing: A New Approach for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol. Ther.* 23, 918–930.

Braak, H., and Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 247, II3–II10.

Brochier, C., Gaillard, M.-C., Diguët, E., Caudy, N., Dossat, C., Ségurens, B., Wincker, P., Roze, E., Caboche, J., Hantraye, P., et al. (2008). Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiol. Genomics* 33, 170–179.

Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., Brouillet, E., Hantraye, P., Bonvento, G., and Déglon, N. (2009). Engineered lentiviral vector targeting astrocytes *In vivo*. *Glia* 57, 667–679.

Cookson, M.R. (2010). The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 791–797.

Cresto, N., Gardier, C., Gubinelli, F., Gaillard, M.-C., Liot, G., West, A.B., and Brouillet, E. (2019). The Unlikely Partnership Between LRRK2 and  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurosci.* 49, 339–363.

Di Maio, R., Hoffman, E.K., Rocha, E.M., Keeney, M.T., Sanders, L.H., De Miranda, B.R., Zharikov, A., Van Laar, A., Stepan, A.F., Lanz, T.A., et al. (2018). LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 10, eaar5429.

Dusonchet, J., Kochubey, O., Stafa, K., Young, S.M., Zufferey, R., Moore, D.J., Schneider, B.L., and Aebischer, P. (2011). A Rat Model of Progressive Nigral Neurodegeneration Induced by the Parkinson's Disease-Associated G2019S Mutation in LRRK2. *J. Neurosci.* 31, 907–912.

Francelle, L., Galvan, L., Gaillard, M.C., Guillermier, M., Houitte, D., Bonvento, G., Petit, F., Jan, C., Dufour, N., Hantraye, P., et al. (2015). Loss of the thyroid hormone-binding protein Crym renders striatal neurons more vulnerable to mutant huntingtin in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1563–1573.

Galvan, L., Francelle, L., Gaillard, M.-C., de Longprez, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Liot, G., Cambon, K., Stimmer, L., Luccantoni, S., Flament, J., et al. (2018). The striatal kinase DCLK3 produces neuroprotection against mutant huntingtin. *Brain* 141, 1434–1454.

Gilks, W.P., Abou-Sleiman, P.M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A.J., Shaw, K., Bhatia, K.P., Bonifati, V., Quinn, N.P., et al. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet* 365, 415–416.

Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S., et al. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 7, 583–590.

Higashi, S., Moore, D.J., Colebrooke, R.E., Biskup, S., Dawson, V.L., Arai, H., Dawson, T.M., and Emson, P.C. (2007). Expression and localization of Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 in the mouse brain. *J. Neurochem.* 100, 368–381.

Hottinger, A.F., Azzouz, M., Déglon, N., Aebischer, P., and Zurn, A.D. (2000). Complete and Long-Term Rescue of Lesioned Adult Motoneurons by Lentiviral-Mediated Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Facial Nucleus. *J. Neurosci.* 20, 5587–5593.

Jaleel, M., Nichols, R.J., Deak, M., Campbell, D.G., Gillardon, F., Knebel, A., and Alessi, D.R. (2007). LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem. J.* 405, 307–317.

Jorgensen, N.D., Peng, Y., Ho, C.C.-Y., Rideout, H.J., Petrey, D., Liu, P., and Dauer, W.T. (2009). The WD40 Domain Is Required for LRRK2 Neurotoxicity. *PLoS ONE* 4.

Kett, L.R., Boassa, D., Ho, C.C.-Y., Rideout, H.J., Hu, J., Terada, M., Ellisman, M., and Dauer, W.T. (2012). LRRK2 Parkinson disease mutations enhance its microtubule association. *Hum. Mol. Genet.* 21, 890–899.

Lee, B.D., Shin, J.-H., VanKampen, J., Petrucelli, L., West, A.B., Ko, H.S., Lee, Y., Maguire-Zeiss, K.A., Bowers, W.J., Federoff, H.J., et al. (2010). Inhibitors of Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Protect Against LRRK2-Models of Parkinson's Disease. *Nat. Med.* 16, 998–1000.

Lee, J.-W., Tapias, V., Di Maio, R., Greenamyre, J.T., and Cannon, J.R. (2015). Behavioral, neurochemical, and pathologic alterations in bacterial artificial chromosome transgenic G2019S leucine-rich repeated kinase 2 rats. *Neurobiol. Aging* 36, 505–518.

Lesage, S., and Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* 18, R48–R59.

Lewis, P.A., Greggio, E., Beilina, A., Jain, S., Baker, A., and Cookson, M.R. (2007). The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 668–671.

Lin, X., Parisiadou, L., Gu, X.-L., Wang, L., Shim, H., Sun, L., Xie, C., Long, C.-X., Yang, W.-J., Ding, J., et al. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron* 64, 807–827.

Liu, Z., Bryant, N., Kumaran, R., Beilina, A., Abeliovich, A., Cookson, M.R., and West, A.B. (2018). LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network. *Hum. Mol. Genet.* 27, 385–395.

Lobbestael, E., Civiero, L., Wit, T.D., Taymans, J.-M., Greggio, E., and Baekelandt, V. (2016). Pharmacological LRRK2 kinase inhibition induces LRRK2 protein destabilization and proteasomal degradation. *Sci. Rep.* 6, 33897.

Marte, A., Russo, I., Rebosio, C., Valente, P., Belluzzi, E., Pischedda, F., Montani, C., Lavarello, C., Petretto, A., Fedele, E., et al. (2019). Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylation on synapsin I regulates glutamate release at pre-synaptic sites. *J. Neurochem.*

Mata, I.F., Wedemeyer, W.J., Farrer, M.J., Taylor, J.P., and Gallo, K.A. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci.* 29, 286–293.

Mestre-Francés, N., Serratrice, N., Gennetier, A., Devau, G., Cobo, S., Trouche, S.G., Fontès, P., Zussy, C., De Deurwaerdere, P., Salinas, S., et al. (2018). Exogenous LRRK2G2019S induces parkinsonian-like pathology in a nonhuman primate. *JCI Insight* 3.

Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11382–11388.

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. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 46, 989–993.

Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simón, J., van der Brug, M., de Munain, A.L., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., et al. (2004). Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease. *Neuron* 44, 595–600.

- Parisiadou, L., Yu, J., Sgobio, C., Xie, C., Liu, G., Sun, L., Gu, X.-L., Lin, X., Crowley, N.A., Lovinger, D., et al. (2014). LRRK2 regulates synaptogenesis and dopamine receptor activation through modulation of PKA activity. *Nat. Neurosci.* 17, 367–376.
- Pereira, C., Miguel Martins, L., and Saraiva, L. (2014). LRRK2, but not pathogenic mutants, protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress depending on mitochondrial function and endocytosis in a yeast model. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 2025–2031.
- Piccoli, G., Condliffe, S.B., Bauer, M., Giesert, F., Boldt, K., Astis, S.D., Meixner, A., Sarioglu, H., Vogt-Weisenhorn, D.M., Wurst, W., et al. (2011). LRRK2 Controls Synaptic Vesicle Storage and Mobilization within the Recycling Pool. *J. Neurosci.* 31, 2225–2237.
- Piccoli, G., Onofri, F., Cîrnaru, M.D., Kaiser, C.J.O., Jagtap, P., Kastenmüller, A., Pischedda, F., Marte, A., von Zweydford, F., Vogt, A., et al. (2014). Leucine-rich repeat kinase 2 binds to neuronal vesicles through protein interactions mediated by its C-terminal WD40 domain. *Mol. Cell. Biol.* 34, 2147–2161.
- Poewe, W. (2008). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 15, 14–20.
- Ramonet, D., Daher, J.P.L., Lin, B.M., Stafa, K., Kim, J., Banerjee, R., Westerlund, M., Pletnikova, O., Glauser, L., Yang, L., et al. (2011). Dopaminergic Neuronal Loss, Reduced Neurite Complexity and Autophagic Abnormalities in Transgenic Mice Expressing G2019S Mutant LRRK2. *PLoS ONE* 6.
- Rodriguez-Oroz, M.C., Jahanshahi, M., Krack, P., Litvan, I., Macias, R., Bezard, E., and Obeso, J.A. (2009). Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 8, 1128–1139.
- Ruiz, M., and Déglon, N. (2012). Viral-mediated overexpression of mutant huntingtin to model HD in various species. *Neurobiol. Dis.* 48, 202–211.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 41, 1303–1307.
- Sheng, D., Qu, D., Kwok, K.H.H., Ng, S.S., Lim, A.Y.M., Aw, S.S., Lee, C.W.H., Sung, W.K., Tan, E.K., Lufkin, T., et al. (2010). Deletion of the WD40 Domain of LRRK2 in Zebrafish Causes Parkinsonism-Like Loss of Neurons and Locomotive Defect. *PLoS Genet.* 6.
- Shogo Kamikawaji, Genta Ito, and Takeshi Iwatsubo (2016). Identification of the Autophosphorylation Sites of LRRK2.
- Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (2006). Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat. Neurosci.* 9, 1231–1233.
- Steger, M., Diez, F., Dhekne, H.S., Lis, P., Nirujogi, R.S., Karayel, O., Tonelli, F., Martinez, T.N., Lorentzen, E., Pfeffer, S.R., et al. (2017). Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *ELife* 6.
- Taymans, J.-M., Vancaenenbroeck, R., Ollikainen, P., Beilina, A., Lobbstaël, E., De Maeyer, M., Baekelandt, V., and Cookson, M.R. (2011). LRRK2 Kinase Activity Is Dependent on LRRK2 GTP Binding Capacity but Independent of LRRK2 GTP Binding. *PLoS ONE* 6.
- Tenovo, O., Rinne, U.K., and Viljanen, M.K. (1984). Substance P immunoreactivity in the post-mortem parkinsonian brain. *Brain Res.* 303, 113–116.
- Vandeputte, C., Taymans, J.-M., Casteels, C., Coun, F., Ni, Y., Van Laere, K., and Baekelandt, V. (2010). Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci.* 11, 92.



Webber, P.J., Smith, A.D., Sen, S., Renfrow, M.B., Mobley, J.A., and West, A.B. (2011). Autophosphorylation in the Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) GTPase Domain Modifies Kinase and GTP-Binding Activities. *J. Mol. Biol.* 412, 94–110.

West, A.B., Moore, D.J., Choi, C., Andrabi, S.A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.-L., Dawson, V.L., et al. (2007). Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 16, 223–232.

Xiong, Y., Coombes, C.E., Kilaru, A., Li, X., Gitler, A.D., Bowers, W.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Moore, D.J. (2010). GTPase Activity Plays a Key Role in the Pathobiology of LRRK2. *PLoS Genet.* 6.

Xiong, Y., Neifert, S., Karuppagounder, S.S., Stankowski, J.N., Lee, B.D., Grima, J.C., Chen, G., Ko, H.S., Lee, Y., Swing, D., et al. (2017). Overexpression of Parkinson's Disease-Associated Mutation LRRK2 G2019S in Mouse Forebrain Induces Behavioral Deficits and  $\alpha$ -Synuclein Pathology. *ENeuro* 4, 1–10.

Xiong, Y., Neifert, S., Karuppagounder, S.S., Liu, Q., Stankowski, J.N., Lee, B.D., Ko, H.S., Lee, Y., Grima, J.C., Mao, X., et al. (2018). Robust kinase- and age-dependent dopaminergic and norepinephrine neurodegeneration in LRRK2 G2019S transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 201712648.

Yue, M., Hinkle, K.M., Davies, P., Trushina, E., Fiesel, F.C., Christenson, T.A., Schroeder, A.S., Zhang, L., Bowles, E., Behrouz, B., et al. (2015). Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice. *Neurobiol. Dis.* 78, 172–195.

Zhou, M., Zhang, W., Chang, J., Wang, J., Zheng, W., Yang, Y., Wen, P., Li, M., and Xiao, H. (2015). Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 584, 184–189.

### Overexpression of the C-terminal fragment of LRRK2 harboring the G2019S substitution in substantia nigra dopaminergic neurons increases the neurotoxicity of mutant A53T $\alpha$ -synuclein *in vivo*

Noémie Cresto<sup>1,2</sup>, Camille Gardier<sup>1,2</sup>, Marie-Claude Gaillard<sup>1,2</sup>, Francesco Gubinelli<sup>1,2</sup>, Charlène Josephine<sup>1,2</sup>, Gwenaëlle Auregan<sup>1,2</sup>, Martine Guillermier<sup>1,2</sup>, Suéva Bernier<sup>1,2</sup>, Caroline Jan<sup>1,2</sup>, Pauline Gipchtein<sup>1,2</sup>, Philippe Hantraye<sup>1,2</sup>, Gilles Bonvento<sup>1,2</sup>, Karine Cambon<sup>1,2</sup>, Géraldine Liot<sup>1,2</sup>, Alexis-Pierre Bemelmans<sup>1,2</sup>, Emmanuel Brouillet<sup>1,2</sup> §

<sup>1</sup> CEA, DRF, Institut François Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRCeN), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> CNRS, CEA, Paris-Sud Univ., Univ. Paris-Saclay, Neurodegenerative Diseases Laboratory (UMR9199), F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

#### **Abstract (272)**

Alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn) and leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) proteins are likely to play crucial roles both in sporadic and familial forms of Parkinson's disease (PD). The most prevalent mutation in LRRK2 is the G2019S substitution which induces neurotoxicity through an increase of its kinase activity. Interplay between LRRK2 and  $\alpha$ -syn may be involved in the neurodegeneration of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra (SNpc) in PD. Here, we aimed at studying whether LRRK2<sup>G2019S</sup> could increase the neurotoxicity induced by a mutant form of  $\alpha$ -syn (A53T mutation) *in vivo* in DA neurons. We used a co-infection approach with AAV2/6 vectors encoding  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>, and the C-terminal part of LRRK2 ( $\Delta$ LRRK2) containing the kinase domain with either the G2019S mutation ( $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>) alone or with the D1994A mutation ( $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup>) that inactivates the kinase activity of LRRK2. AAVs were co-injected into the rat SNpc and histological evaluation was performed at 6 and 15 weeks post-infection (P.I.). A majority of SNpc neurons co-expressed  $\Delta$ LRRK2 and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> after infection and all the LRRK2 forms were expressed at the same level.  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> alone produced no cell loss at 15 weeks P.I.. Results showed that co-expression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> produced greater loss of DA neurons than that produced by  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone. In contrast, LRRK2 constructs *in vivo* did not change cell loss induced by a different aggregating protein, the N-terminal domain of mutant huntingtin. We also show that the inactive form  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup> did not change the toxicity of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> in comparison with the active form  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>. Thus, these results show that mutant LRRK2 may selectively facilitate  $\alpha$ -syn toxicity in dopaminergic cells *in vivo* through a cell-autonomous mechanism involving its kinase activity.

#### **Introduction**

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder affecting approximately seven million people worldwide. Early in the course of the disease, the most obvious symptoms are movement-related, include shaking (resting tremor), rigidity, and slowness of movement. The neuropathological hallmarks of PD are characterized by a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) and the presence of neuronal aggregates (Lewy bodies) and dystrophic Lewy neurites containing the protein  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) (Braak et Braak 2000). There exists no treatment to delay neurodegeneration. The cause of  $\alpha$ -syn aggregation and preferential death of DA neurons are unknown. PD is mainly a sporadic neurodegenerative disorder but approximately 10% of the cases are of genetic origin. Among all the causative genes, mutations in *SNCA* coding for the  $\alpha$ -syn protein and in LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) have been proved to associate with autosomal dominant (AD) PD (Lesage et Brice 2009).

Duplication, triplication and rare mutations (A53T (Polymeropoulos et al. 1997); A30P (Krüger et al. 1998); E46K (Zarranz et al. 2004)) in the *SNCA* gene have been found in families with dominantly inherited PD and are associated with early-onset forms of PD with an amplification of  $\alpha$ -syn aggregation (Chartier-Harlin et al. 2004; Singleton et al. 2003). Compelling evidence indicate that  $\alpha$ -syn is central in PD and plays a key role through different aggregated forms, including abnormally phosphorylated aggregates that produce multiple cellular alterations eventually leading to DA cell death (Saito et al. 2003).

Mutations in *LRRK2* are the most common genetic cause of both familial and sporadic PD (Paisán-Ruíz et al. 2004; Zimprich et al. 2004). There are also variants in *LRRK2* locus that are considered risk factors for developing PD. The most prevalent mutation in *LRRK2* is the G2019S substitution accounting for 5–6% of autosomal-dominant (AD) familial and 1–2% of de novo generic PD cases (Gilks et al. 2005; Healy et al. 2008). Patients harboring the G2019S and other mutations are clinically indistinguishable from idiopathic PD cases, including the presence of Lewy bodies (LBs) in most cases (Biskup et West 2009; Yahalom et al. 2014). In general, although *LRRK2* variants or mutations are considered risk factors of developing PD, the onset of symptoms in *LRRK2* carriers has been found similar to that of idiopathic PD cases (Brockmann et al. 2011; Oosterveld et al. 2015). The mechanisms underlying *LRRK2* neurotoxicity remain unknown. It is now generally admitted that the G2019S mutation increases *LRRK2* kinase activity (both autophosphorylation and phosphorylation of exogenous kinase substrates) and that neurotoxicity originates from this increased activity (Lee et al. 2010; West et al. 2007). Moreover, it was recently shown that *LRRK2* was activated in the SNpc of idiopathic PD patients (Di Maio et al. 2018), highlighting the importance of *LRRK2*'s kinase activity in the pathogenesis of both familial and sporadic forms of PD.

Because of the presence of LBs in symptomatic *LRRK2* mutation carriers and the presence of *LRRK2* in LBs, the hypothesis of a functional (and possibly physical) interaction between *LRRK2* and  $\alpha$ -syn has been suggested. Indeed *LRRK2* toxicity may require the presence of  $\alpha$ -syn and conversely, the presence of variants/mutant *LRRK2* could increase the risk and/or impact on the  $\alpha$ -synucleopathy in PD. Of importance, the level of kinase activity of *LRRK2* could thus be a modifier of  $\alpha$ -syn toxicity. If this turns out to be true, the therapeutic implication would be extremely important: the regulation of *LRRK2* kinase activity could be theoretically beneficial in slowing disease progression not only in *LRRK2* variants carriers but also in idiopathic PD. Recent experiments in transgenic mouse models of *LRRK2* and  $\alpha$ -syn support these hypotheses. In particular, results of experiments in genetic models of mutant *LRRK2* or wild type *LRRK2*, in particular the effect of the pharmacological blockade of the kinase activity of *LRRK2*<sup>G2019S</sup> in these models, indicate that *LRRK2* may increase  $\alpha$ -syn toxicity (Bieri et al. 2019; Daher et al. 2014, 2015; Lin et al. 2009; Novello et al. 2018).

However, the mechanisms underlying the “protoxic” effect of *LRRK2* (especially the G2019S mutation) on  $\alpha$ -syn toxicity are not known. The exact role of the kinase domain is not totally demonstrated. Pharmacological interventions suggested that the kinase activity probably takes part in the functional interaction between the two proteins (for a review see Cresto et al. 2019). However, the requirement of the other functional domains of *LRRK2*, in particular the N-terminal domains that regulate many cellular functions through interactions with protein partners have not been ruled out. In addition, it is not known whether the potentiation of  $\alpha$ -syn toxicity by the presence of *LRRK2*<sup>G2019S</sup> is related solely to a cell-autonomous mechanism. Alternatively, *LRRK2*-expressing cells that surround DA neurons, especially microglial cells and astrocytes, could also play a role. Indeed, pharmacological interventions with *LRRK2* inhibitors or pan-cellular knock out or transgenic animals expressing wild type *LRRK2* or mutant *LRRK2* did not allow differentiating between cell-autonomous versus non cell-autonomous mechanisms *in vivo*.

We have previously shown that the C-terminal domain of *LRRK2* ( $\Delta$ *LRRK2*) alone possessed a kinase activity that was significantly increased by the G2019S mutation.  $\Delta$ *LRRK2* fragments did not phosphorylate Rab10, a well-known substrate of full length *LRRK2*.  $\Delta$ *LRRK2* is therefore not expected to behave as the full length protein. However, it was sufficient to induce a significant neurodegeneration *in vivo* when it bore the G2019S mutation, 6 months after its overexpression in the SNpc via AAV vectors (Cresto et al. In press). In the present study, in order to precisely address the above questions in a relevant cellular context, we studied the effect of this C-terminal domain of *LRRK2* harboring the G2019S mutation ( $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup>) or its inactive form (mutations G2019S plus D1994A, named DK)  $\Delta$ *LRRK2*<sup>DK</sup> on the neurotoxicity of  $\alpha$ -syn with the A53T mutation ( $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>). For this purpose, we performed experiments using AAVs allowing the over expression of the different forms of  $\Delta$ *LRRK2* and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone or in combination in DA neurons of the SNpc in adult rats.

Quantitative histological evaluation showed that while  $\Delta$ LRRK2<sup>G2091S</sup> alone produced no loss of DA neurons, it could significantly increase  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>-induced neurotoxicity. This effect was not seen with the inactive form  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup>.

## **Materials and methods**

### Viral construction and production

*Adeno-associated viral vector (AAV)*. Plasmids constructs were packaged into AAV2/6 capsids as described previously (Berger et al. 2015). Briefly, viral particles were produced by co-transfection of HEK-293T cells with (1) an adenovirus helper plasmid (pXX6-80), (2) an AAV packaging plasmid carrying the rep2 and cap8 genes and (3) the AAV2 expression vector containing the transgene. 72 hours following transfection, recombinant vectors were purified and concentrated from cell lysate and supernatant by ultracentrifugation on an iodixanol density gradient followed by dialysis against PBSMK (0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.25 mM KCl in PBS). Concentration of the vector stocks was estimated by real-time-PCR following the method described by Aurnhammer et al. (Aurnhammer et al. 2012) and expressed as viral genomes per ml of concentrated stocks (Vg/ml). AAVs coding for  $\Delta$ LRRK2 (WT, G2019S, and “kinase dead),  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and GFP were produced.

### Stereotaxic injection

Adult Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories) weighing ~250 g were housed under a 12 h light/12 h dark cycle, with *ad libitum* access to food and water, in accordance with European Community (Directive 2010-63/EEC) and French (Code Rural R214/87-130) regulations. Experimental procedures were approved by the local ethics committee and registered with the French Research Ministry (committee #44, approval #12-100 and APAFIS#1372-2015080415269690v2). For stereotaxic injections, the animals were deeply anaesthetised with 4% isoflurane followed by a mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and placed in a stereotaxic frame. Recombinant adeno-associated viral vectors were injected unilaterally into the substantia nigra, at the following stereotaxic coordinates: +3.4 mm anterior to the interaural zero and  $\pm$ 2.0 mm lateral to bregma, at a depth of -7.8 mm relative to the skull, with the tooth bar set at -3.3 mm. We injected 4  $\mu$ l of virus at a concentration of  $2.5 \times 10^{10}$  viral particles per site for single injection and in case of co-injection,  $2.5 \times 10^{10}$  vg of each vectors were injected for a total of  $5 \times 10^{10}$  viral particles per site, with a 34-gauge blunt-tipped needle linked to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe by a polyethylene catheter, at a rate of 0.25  $\mu$ l/min, with an automatic pump (CMA-4004). The needle was left in place for five minutes and was then slowly withdrawn.

### Tissue processing

For all procedures, rats were first deeply anaesthetised by isoflurane inhalation followed by the intraperitoneal injection of a lethal dose of sodium pentobarbital.

For immunohistochemistry, rats were transcardially perfused with 300 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer at a rate of 30 ml/min. After perfusion, the brain of each rat was removed quickly and immersed in ice-cold 4% paraformaldehyde for at least 24 h, before transfer to 15% sucrose for 24 hours and then 30% sucrose the next day, for cryoprotection. The brains were then cut into 40  $\mu$ m sections on a freezing microtome (CM1900, Leica, Germany). Serials sections of the striatum and midbrain were stored in antifreeze solution (30% sucrose, 30% ethylene glycol in PBS) until use.

### Immunohistological analysis and quantification

Immunohistochemistry. The sections were removed from the antifreeze solution and washed in PBS. Endogenous peroxidase activity was quashed by transferring these sections to 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes at room temperature (RT) and washing them three times with PBS, for 10 min each. The sections were then blocked by incubation with 4.5% normal goat serum for 30 min in PBS-T (0.2% Triton X-100 in PBS) and they were then incubated overnight with primary antibody in 3% normal goat serum in PBS-T, at 4°C, with gentle shaking (anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody: MAB318 clone LNC1, 1:3000; AB152: 1:1000, anti-hemagglutinin tag (HA), Covance clone 11, 1:1000; anti- $\alpha$ -synuclein, syn 211, 1:1000; anti-phospho- $\alpha$ -synS129, 1:5000). The next day, these sections were removed from the primary antibody solution, washed three times and incubated for 1

hour at room temperature with the appropriate biotinylated secondary antibody in PBS-T (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, 1:1000). The sections were then washed and incubated with ABC complex solution in PBS-T (1:250, reagents A and B combined in a 1:1 ratio, Vector Laboratories) for 1 h. The sections were then incubated with DAB for 30 s to 1 min and mounted on slides, in Eukitt mounting medium.

Cell counting. Optical fractionators sampling was carried out on a Zeiss microscope AxioPlan. Midbrain dopaminergic neurons were outlined on the basis of TH immunolabelling, with reference to a coronal atlas of the rat brain (Paxinos and Watson, 6<sup>th</sup> edition). TH-positive cells were counted by unbiased stereology in the entire SNpc and the number of positive neurons per section was calculated with Mercator Software (Explora Nova, France). We placed 100 × 100 μm grids in a systematic random manner, 80 × 80 μm apart, with a 3 μm offset from the surface of the section. Quantification was performed on twelve serial sections spaced by 200 μm corresponding to the entire SNpc.

The phosphorylation of the α-syn in S129 (P-α-syn<sup>S129</sup>) was evaluated by counting using stereology methods the number of positive-neurons for P-α-syn<sup>S129</sup> in the SNpc. The SNpc was delimited using the Nissl staining and grids (250 × 250 μm) were placed spaced by 100 × 100 μm. Quantification was performed on six serial sections spaced by 400 μm corresponding to the entire SNpc. In the striatum, a threshold was applied to select only the positive-immunostaining for P-α-syn<sup>S129</sup> and the quantification was done on three slices corresponding to the beginning, the middle and the end of the striatum.

Immunofluorescence. The procedure used was similar to that for immunohistochemistry, but without the incubation in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The primary antibodies used for the immunofluorescence procedure were the same than previously described (IBA1, Dako, 1:1000). On the first day, sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C. The next day, they were incubated with a fluorescent secondary antibody: Alexa Fluor 594-labeled goat anti-rabbit IgG or Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG (1:1000, Life Technologies) for 1 hour at RT. The sections were then washed and incubated overnight at 4°C with another primary antibody. Finally, they were incubated with a second fluorescent secondary antibody, Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG or 594-labeled goat anti-mouse IgG (1:1000, Life Technologies) for 1 hour at room temperature. The sections were stained with DAPI, washed and mounted in a fluorescence mounting medium. Images were acquired with a laser confocal microscope (SP8, Leica, Germany) or an epifluorescence microscopy (DM8000, Leica, Germany).

Colocalization. The percentage of colocalization between ΔLRRK2 and α-syn was determined by counting the number of cells co-expressing both ΔLRRK2 and α-syn proteins divided by the number of cells expressing α-syn alone. Images were acquired with a laser confocal microscope (SP8, Leica, Germany). On the same acquisitions, the expression levels of ΔLRRK2 and α-syn proteins were evaluated on three coronal sections in the substantia nigra. Twenty cells co-expressing both ΔLRRK2 and α-syn proteins were delineated per animal using image J software and the mean fluorescence intensity in the red and in the green channels (corresponding to ΔLRRK2 and α-syn proteins respectively) was measured in each cell.

Fluorescence intensity measurement. Striatal dopaminergic innervation at 15 weeks was quantified by measuring the fluorescence intensity of TH-immunoreactive terminals on three coronal striatal sections. These sections were observed by epifluorescence microscopy at a magnification of 63X, and the fluorescence intensity was determined with MorphoStrider software (Explora Nova, France).

Microglia area measurement. The area occupied by microglia was evaluated by confocal microscopy at a magnification of 20X in the dorso-medial part of the striatum and in the SN *pars reticulata*. A threshold was applied and the area of twenty microglia cells was measured per acquisition. Three acquisitions per animal were used.

#### Statistical analysis

Data were analysed by two-tailed, one-way analysis of variance (ANOVA) performed with Statistica software (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and, when appropriate, LSD post-hoc correction for multiple comparisons

was applied. Unpaired Student's t-tests were performed for pairwise comparisons. The annotations used to indicate the level of significance are as follows: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## Results

### Determination of the experimental conditions to detect a potential synergy between AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> toxicity

We investigated whether LRRK2 could increase the toxicity of  $\alpha$ -syn in DA neurons through cell-autonomous mechanisms. For this reason, we chose to use AAVs that allow selective expression in neuronal cells and produce efficient transduction of a large volume of brain tissue thanks to their good diffusion properties. In our previous work (Cresto et al. In press), we showed that the C-terminal part of LRRK2<sup>G2019S</sup> ( $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>: 1330-2527 aa) retains, at least in part, the biochemical properties of full length LRRK2<sup>G2019S</sup>, including an increased kinase activity in comparison to wild type fragment. In addition, we found that the overexpression of the C-terminal part of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> with AAVs in the adult rat SNpc produced partial (~30%) but significant loss of DA neurons at 25 weeks post-infection, whereas the overexpression of the wild type form of LRRK2 ( $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup>) was not toxic. In the present study, we used a similar approach and, to optimize the  $\Delta$ LRRK2 constructs, we extended the cloned fragments to insert the serine 1292 (aa 1283-2527) (Fig. 1, A). This residue has been shown to play a key role in LRRK2<sup>G2019S</sup> toxicity (Sheng et al. 2012). Biochemical analysis of cells transfected with these LRRK2 constructs showed that all three fragments were expressed at similar levels (Fig.1, B).

We studied the effects of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>, AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup> alone at 15 weeks P.I.. Each AAV was injected unilaterally into the SNpc ( $2.5 \times 10^{10}$  vg). In addition to the three experimental groups, a control group received injections of vehicle (PBS/pluronic acid). The integrity of the nigrostriatal pathway was assessed using unbiased stereology to count the number of DA neurons which displayed Tyrosine Hydroxylase (TH) staining in the injected part of the SNpc (Fig. 1, C). Observation at low-magnification revealed no major loss of TH-positive cells in the different groups injected with AAVs coding for LRRK2 fragments. The total number of TH-positive cells in the SNpc did not differ significantly between the control group (PBS) and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup>, AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> or AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup> (Fig. 1, D). Thus, these results suggested that these  $\Delta$ LRRK2 fragments alone did not trigger significant neurodegeneration of DA neurons at 15 weeks P.I..

Since we asked whether AAVs coding for different  $\Delta$ LRRK2 constructs could increase the toxicity of AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>, we searched for an injection protocol leading to mild degeneration, in such a way that a potential "protoxic" effect of  $\Delta$ LRRK2 constructs could be easily detected. We conducted pilot experiments to determine the appropriate dose (titers) of AAV-  $\alpha$ -syn alone that would lead to progressive and partial loss of DA neurons. These experiments showed that a significant loss of DA neurons (~30%) could be obtained at 12 and 15 weeks after the infection with AAV-  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> ( $2.5 \times 10^{10}$  particles) (Supplementary Fig. 1, A-B). We also observed the presence of pS129  $\alpha$ -syn and ThioS positive aggregates in the surviving neurons of the SNpc, indicating an abnormal processing of  $\alpha$ -syn in these animals (Supplementary Fig. 1, C).

Thus, these results indicated that the co-infection protocol with AAV-  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and the evaluation of DA cell loss at 15 week P.I. were suitable to detect a potential synergy of toxicity between the two pathological transgenes.

### Effects of the co-infection with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>

We next asked with this co-infection paradigm (with  $2.5 \times 10^{10}$  particles for each vector) whether the presence of the different LRRK2 fragments (wild type, G2019S and G2019S/D1994A) in DA neurons could modify the toxicity of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>.

We first studied the neurotoxic effects produced by AAV-  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> in presence or absence of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> at 15 weeks P.I.. We characterized the co-localization of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and LRRK2 fragments in the SNpc after co-infection, since we aimed at investigating the combined effects of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and different LRRK2 fragments in neurons. Analysis using confocal microscopy showed that  $\alpha$ -syn expression in the SNpc was high

in TH positive neurons (Fig. 2, A). In average, 70% of neurons co-expressed  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and LRRK2 fragments (Fig. 2, B).

We evaluated the toxic effects of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> in presence or in absence of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>. The AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone produced a significant 38% loss of TH-positive cells as measured by unbiased stereology in the SNpc at 15 week P.I. (mean count +/- SEM: Control, 12,344 +/- 734; AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>, 7,555 +/- 527). The co-injection of AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> with AAV-GFP (as a control of viral load) produced a loss of DA neurons similar to that obtained with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone (6,601 +/- 360). Of interest, the co-infection with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> produced a larger loss of DA neurons (Mean counts +/- SEM: 5,585 +/- 355) that was statistically significant (Fig 3, A). In both  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>/GFP and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>/ $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> groups, we evaluated the impact of SNpc cell loss on the level of dopaminergic terminals in the dorso-medial striatum using TH-immunofluorescence (Fig. 4, A). These measurements were performed in the dorsal striatum which receives projection from the injected SNpc region. In comparison to the control group (PBS), the TH immunoreactivity in the striatum was reduced by 15% in both  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>/GFP and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>/ $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> groups. This small  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>-induced loss of TH-positive fibres was similar in the GFP and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> groups (Fig. 4, C).

We also counted the number of SNpc cells showing P- $\alpha$ -synS129 immunoreactivity in the different groups, a marker of an abnormal processing of  $\alpha$ -syn (Fig. 3, C). The number of P- $\alpha$ -synS129-positive cells was significantly lower in the group co-infected with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> than that of the groups infected with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone or in combination with AAV-GFP (Fig. 3, D). The P- $\alpha$ -synS129 immunoreactivity was also evaluated in the striatum and, consistent with the results obtained in the SNpc, we found lower levels of aggregated  $\alpha$ -syn in the striatum of rats co-infected with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> than in rats infected with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> / GFP (Fig. 3, E-F).

#### Differential effects of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994A</sup> on AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> toxicity

We next investigated whether the effect of AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> on AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>-induced toxicity was dependent on the kinase activity of the LRRK2 construct. To address this question, we compared the effects of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> with those of the kinase dead form  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup>. In these experiments, we chose an earlier time point P.I. (6 weeks).

We first compared the levels of transgene expression after infection with  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> or AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup>. Quantitative immunofluorescence analyses showed that almost the entire SNpc was infected by the AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> when co-infected with either AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> or AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> (Fig. 5). We also re-evaluated the co-localisation of LRRK2-related transgenes and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> (Fig. 6). Results showed that 76% of neurons expressed both  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and  $\Delta$ LRRK2 (Fig. 6, C), a result consistent with what we observed in the experiments described above (see Fig. 2). At higher magnification, we evaluated the level of fluorescence intensity corresponding to  $\Delta$ LRRK2-HA staining. The results showed that  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> were expressed at the same level in SNpc neurons (Fig. 6, C). In addition, we found that the  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> protein was expressed at the same levels in neurons co-expressing  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> (Fig. 6, C).

We then assessed the loss of DA neurons produced by AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> when co-injected with either AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> or AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup>. Results indicated that the loss of DA neurons induced by  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> was significantly lower in presence of  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> than that in presence of  $\Delta$ LRRK2<sup>GS</sup> (Fig. 7, A-B). The number of cells with P- $\alpha$ -synS129 immunoreactivity was similar in the  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> groups (Fig. 7, C-D).

Finally, because of the role of neuroinflammation in neurodegeneration observed in  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> models, we evaluated at this early time point (6 weeks P.I.) the status of microglial cells with immunohistochemistry using a validated marker of these glial cells, Iba1. Quantifications in the SN and in the striatum showed that, while  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone produced microglial activation,  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> did not have any impact on the microglial activation induced by the mutant  $\alpha$ -syn (supplementary Fig. 2).

Thus, these results indicated that the synergistic effect of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> on the toxicity of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> towards DA neurons depends on its kinase activity.

## Discussion

The mechanisms leading to the degeneration of DA neurons in PD patients carrying mutations of the *LRRK2* gene are unknown. It is generally established that *LRRK2*<sup>G2019S</sup> leads to an increased kinase activity and that this abnormally increased kinase activity would lead to cell death (Greggio et al. 2006; Lee et al. 2010; Smith et al. 2006; West et al. 2007). Moreover, we have previously shown that the C-terminal domain of *LRRK2* alone was sufficient to observe the toxic effect of the G2019S mutant in the SNpc of rats, 6 months after its overexpression in the SNpc via AAV vectors (Cresto et al. In press). In addition, a role of  $\alpha$ -syn in *LRRK2*<sup>G2019S</sup> toxicity has been suggested (Bieri et al. 2019; Daher et al. 2014, 2015; Lin et al. 2009; Novello et al. 2018). Indeed, neuropathological evaluation of the brain of PD patients with *LRRK2* mutations shows the presence of bona fide LBs and Lewy neurites (Giasson et al. 2006). However, the specific role of the kinase activity in the crosstalk between *LRRK2* and  $\alpha$ -syn is controversial. In other words, how the kinase activity of *LRRK2*<sup>G2019S</sup> mutation modulates  $\alpha$ -syn neurotoxicity in the SNpc is unknown.

In the present work, we used an AAV approach to selectively target SNpc DA neurons and investigated how the C-terminal domain of *LRRK2* harboring the G2019S mutation with increased kinase activity could modify the loss of DA neurons produced by overexpression of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> in the rat SNpc. In our experimental conditions, AAV- $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> alone did not produce loss of DA neurons and AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone produced a partial loss of these cells. We found that the loss of DA cells produced by co-expression of  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> was significantly higher than that measured in rats infected with AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone or co-injected with a control vector (AAV-GFP). Conversely, overexpression of the inactive “kinase dead” form  $\Delta$ *LRRK2*<sup>DK</sup> at cellular levels similar to those of  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> did not change the toxicity of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup>. These novel findings are further in support of the hypothesis that the C-terminal domain of *LRRK2*<sup>G2019S</sup> augments the toxic effects of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> through the catalytic activity of its kinase domain.

The histological evaluation we performed after infection of the SNpc with AAV-  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and AAV- $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> showed that both transgenes were overexpressed in DA neurons. In both cases, approximately 70% of the SNpc was infected. After co-infection, co-localization of both transgenes was found in a majority of neurons in the SNpc. Neuropathological evaluation at 15 weeks after infection with AAV-  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> indicated partial loss of DA neurons based on detection of TH-positive cells. This likely reflects neuronal loss, although it cannot be totally ruled out that, at least in part, the loss of TH-immunoreactivity is due to a marked reduction of the expression of this dopamine synthesis enzyme in absence of actual cell death. Cell count using other dopamine markers (e.g. VMAT) and cell staining (e.g. Nissl staining) may help to address this point.

The relevance of overexpressing the C-terminal domain of *LRRK2* as compared to the full length protein is debatable. Indeed,  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> lacks N-terminal domains that are known to play crucial roles in *LRRK2* function. As discussed elsewhere (Cresto et al. In press), biochemical characterization of  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> and  $\Delta$ *LRRK2*<sup>WT</sup> indicated that this *LRRK2* fragment retains properties of full length *LRRK2*, including the ability to dimerize and the increase in kinase activity when the fragment harbors the G2019S substitution. However, we could not observe any phosphorylation of Rab10 by  $\Delta$ *LRRK2*, indicating that the N-terminal part of *LRRK2* is required for the phosphorylation of this particular substrate (Cresto et al. In press). Thus, it is conceivable that overexpression of  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> compared to  $\Delta$ *LRRK2*<sup>WT</sup> leads to abnormal/increased phosphorylation of certain substrates, that at least in part are common with those of full length *LRRK2*, but it is not expected to behave exactly as the full length protein (Deng et al. 2008; Gloeckner et al. 2006; Greggio et al. 2008; Ito et Iwatsubo 2012). The increase of  $\Delta$ *LRRK2* kinase activity with the G2019S mutation could still produce cellular alterations and eventually death of neurons. Supporting this hypothesis, we previously showed that overexpression of the  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> fragment using AAVs triggers neurodegeneration of DA neurons at six month post-infection while the  $\Delta$ *LRRK2*<sup>WT</sup> fragment, expressed at similar high levels, was devoid of obvious neurotoxicity (Cresto et al. In press).

The advantage of the present AAV models, compared to the other existing transgenic models is that we could address the question of the potential exacerbation of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> toxicity by the kinase activity of *LRRK2* directly in the SNpc (Melrose et al. 2010; Ramonet et al. 2011). We could directly investigate whether a functional interaction existed between AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> and- $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> in DA neurons. Our results confirmed the existence of this interaction, since the overexpression of  $\Delta$ *LRRK2*<sup>G2019S</sup> significantly enhanced  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> neurotoxic effects in the rat SNpc. Using transgenic animals, Lin and collaborators showed that the



overexpression of LRRK2 (wild type or G2019S) in forebrain neurons (striatum and cerebral cortex) increased the toxicity of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> (Lin et al. 2009). In these double transgenic mice, significant degeneration of the striatum and cortex, and enhanced accumulation of  $\alpha$ -syn aggregates were found. For technical reasons pathological transgenes were not expressed in the SNpc and no degeneration of DA was detected in these models. Probably, the CamKII $\alpha$  promoter used to drive the expression of the tetracycline transactivator (tTA) that activates the TetO promoter of LRRK2 and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> transgenes in these mice is not active in SNpc DA neurons, since endogenous expression of CamKII $\alpha$  in neurons of the SNpc is low compared to that seen in forebrain neurons. In LRRK2 knockout rats, the toxicity produced by AAV coding for  $\alpha$ -syn is lower than that in wild type rats (Daher et al. 2015). Using crossbreeding of other transgenic models in which promoters driving LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> expression were different (Prion and CMV respectively), Daher and colleagues found no synergy between the transgenes (Daher et al. 2012). These observations and our present results suggest that the synergy between LRRK2 and  $\alpha$ -syn may require expression of the two proteins in the same neurons to occur. Further supporting this view, we found that in our experimental set up, the co-expression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> did not lead to more microglial activation than the expression of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> alone. Thus our results indicate that the synergy between LRRK2 and  $\alpha$ -syn depends, at least in part, on cell-autonomous mechanisms. However, this does not rule out that in patients and other animal models, non-cell autonomous mechanisms could be also involved in the increased vulnerability of brains to  $\alpha$ -syn when mutant LRRK2 is expressed in neurons and glial cells. For example, it has been recently shown that seeding of  $\alpha$ -syn aggregates by exposure of neurons to  $\alpha$ -syn fibrils is increased in neurons expressing mutant LRRK2 (Volpicelli-Daley et al. 2016; Bieri et al. 2019). The levels of LRRK2 activity in microglial cells may also regulate protoxic phenomenon associated with  $\alpha$ -syn induced neuroinflammation (Daher et al. 2014; Maekawa et al. 2016; Russo, Bubacco, et Greggio 2014).

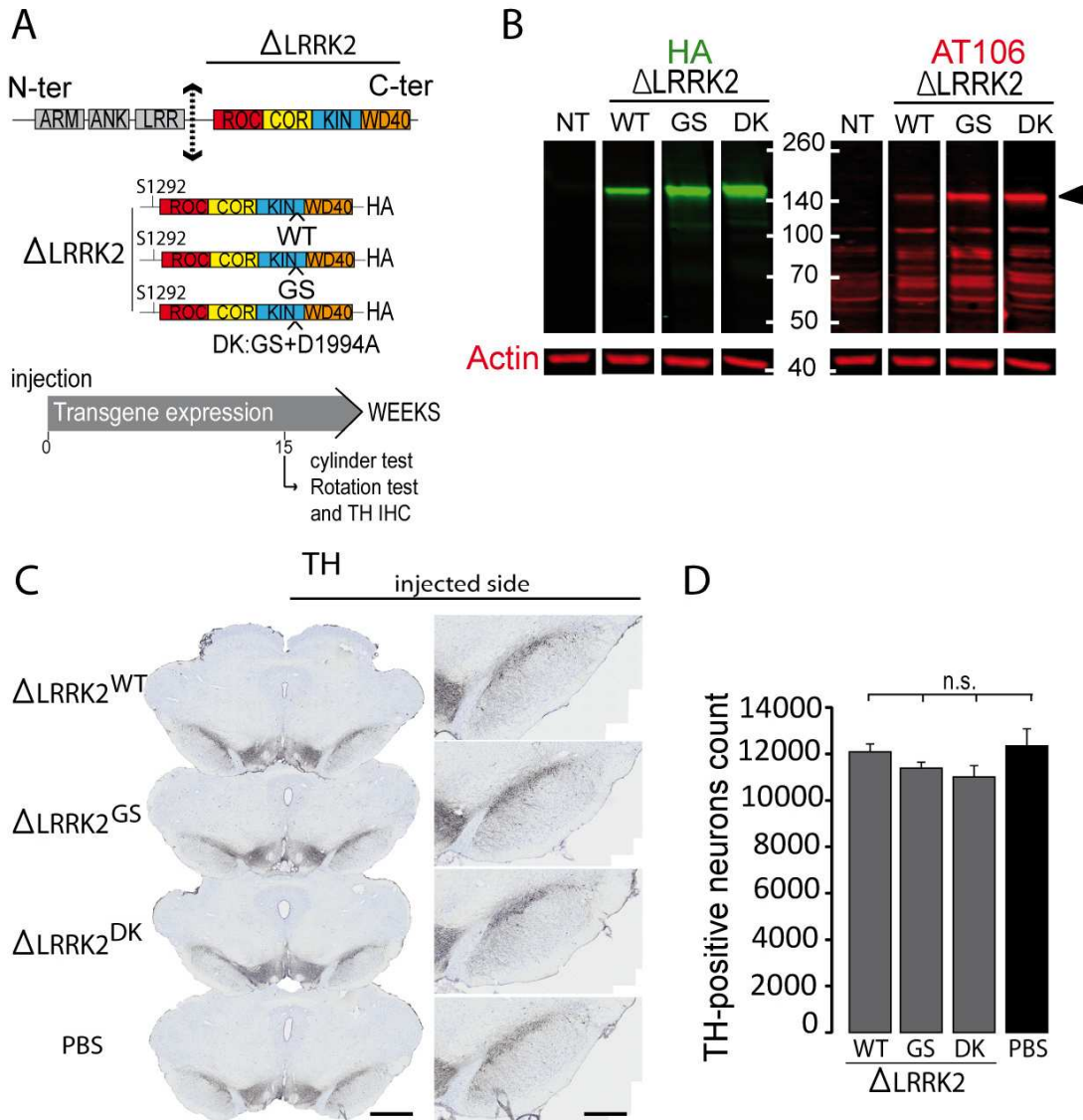
The neuronal mechanisms underlying the synergy between LRRK2 and  $\alpha$ -syn are ill-defined. In particular, the exact role of the kinase domain of LRRK2 is unclear. It is generally accepted that the increased kinase activity of LRRK2<sup>G2019S</sup> compared to wild type LRRK2, through increased phosphorylation of substrates, leads to neurodegeneration possibly through multifactorial cellular changes including disruption of microtubule assembly, mitochondrial defects, and alterations in protein translation (Rosenbusch and Kortholt 2016). However, the hypothesis of a key role of the increased kinase activity of LRRK2 mutations remains controversial. As already mentioned above, different transgenic rodent models expressing LRRK2<sup>G2019S</sup> have been developed and extensively characterized. These models display no (or very limited) degeneration of DA cells in the SNpc. In fact, there exists no transgenic models which express very high levels of LRRK2<sup>G2019S</sup> in the SNpc. The apparent lack of toxicity of LRRK2<sup>G2019S</sup> in the SNpc is likely to be explained by the low level of expression of the transgene in transgenic models, since compelling evidence obtained from different experimental approaches clearly demonstrates that the higher the expression of LRRK2<sup>G2019S</sup> is, the more severe the resulting toxicity gets. There exist rare evidence obtained *in vivo* that show a relationship between the increase kinase activity of LRRK2<sup>G2019S</sup> and neurotoxicity. In the studies using HSV and adenovirus models (Dusonchet et al. 2011; Lee et al. 2010), as well as in our previous study with AAV- $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> (Noemie Cresto et al. In press), the overexpression of LRRK2<sup>G2019S</sup> (or  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup>) in the SNpc was found to produce a loss of DA neurons whereas the infection with wild type LRRK2 produced no toxicity.

Only a few studies addressed directly the role of the kinase in the interaction between  $\alpha$ -syn and LRRK2 toxicity. It was shown that neuroinflammation and neurodegeneration produced by the infection of the SNpc with AAV- $\alpha$ -syn is significantly attenuated in LRRK2 KO rats compared to wild type littermates. In these experiments, the role of the kinase activity was not assessed (Daher et al. 2014). More recently, Daher showed that the toxicity of AAV- $\alpha$ -synuclein in the SNpc was higher in transgenic LRRK2<sup>G2019S</sup> rats than in wild-type rats. Interestingly, in both genotypes, the treatment with the LRRK2 inhibitor PF-06447475 (PF) reduced the toxicity of  $\alpha$ -syn (Daher et al. 2015). This suggested that the exacerbation of  $\alpha$ -syn toxicity by LRRK2<sup>G2019S</sup> could result from the increased catalytic activity of the kinase. However, LRRK2 inhibitors, including PF, produce destabilization of LRRK2, leading to reduced cellular levels of the protein (Lobbestael et al. 2016). Thus, protection by PF against combined  $\alpha$ -syn/ LRRK2<sup>G2019S</sup> toxicity could result from the reduction in LRRK2 levels rather than from actual inhibition of the catalytic activity of the kinase. In the present experiments, we found that whereas expression of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> increased the toxicity of AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> towards DA neurons, the overexpression of the inactive protein  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S/D1994S</sup> produced no change towards the toxicity AAV- $\alpha$ -

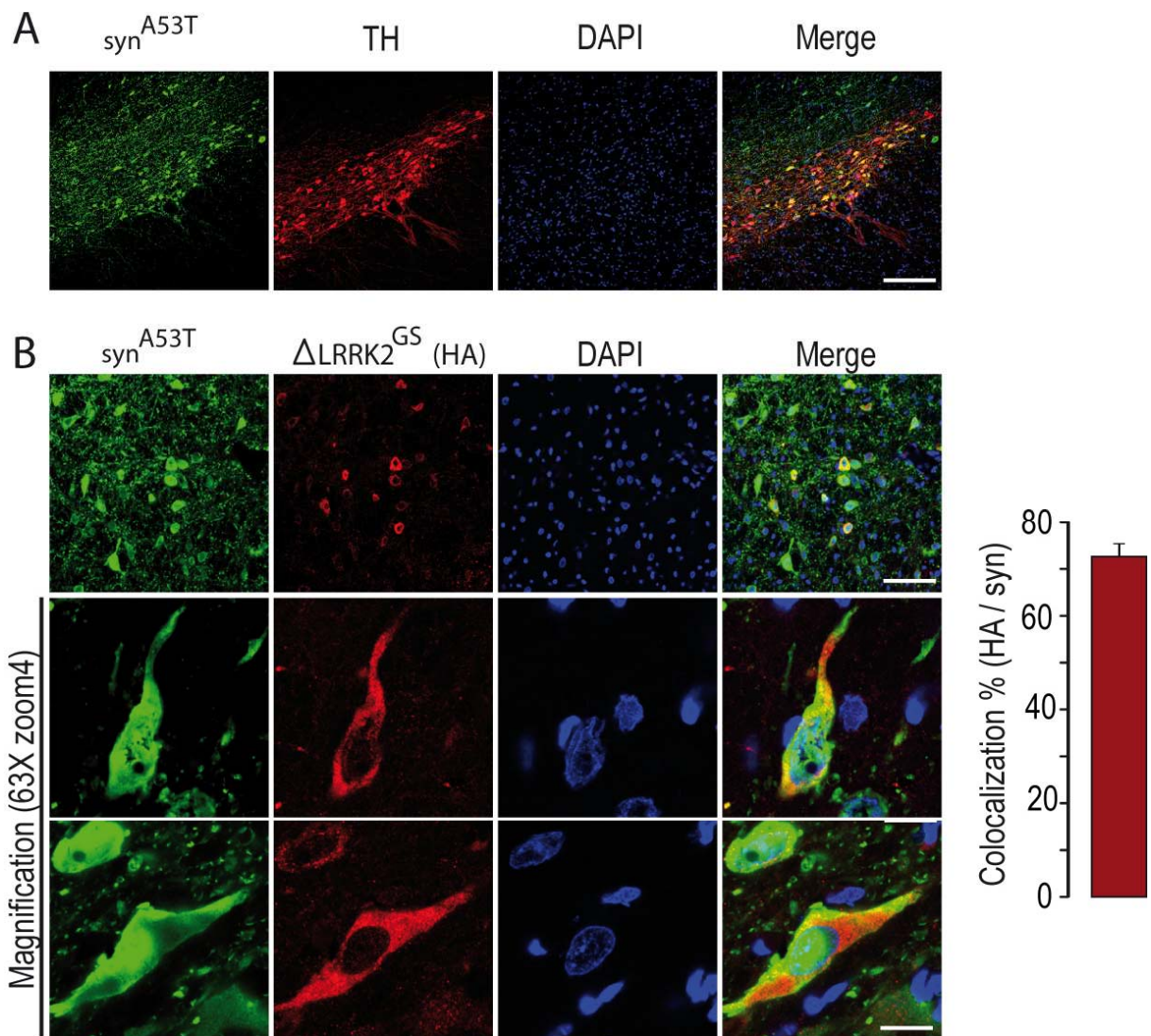
syn<sup>A53T</sup>. In our experiments, we could check that the difference between the toxicity of  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> and that of  $\Delta$ LRRK2<sup>DK</sup> was not related to a difference in protein expression levels. Quantitative confocal analysis indicated that the levels of expression of the two proteins were similar in DA neurons *in vivo*. Thus, it is likely that the difference of effects between  $\Delta$ LRRK2<sup>WT</sup> and  $\Delta$ LRRK2<sup>G2019S</sup> mainly resides in their different kinase activities.

In conclusion, the present study suggests that the presence of the C-terminal part of LRRK2 with the G2019S mutation can potentiate the toxicity of  $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> in DA neurons *in vivo* and that this effect is kinase-dependent. Our “double hit” model in rats, which is relatively simple to develop and handle, might be of interest to directly test the efficacy of new pharmacological or molecular therapies targeting LRRK2 and/or  $\alpha$ -syn.

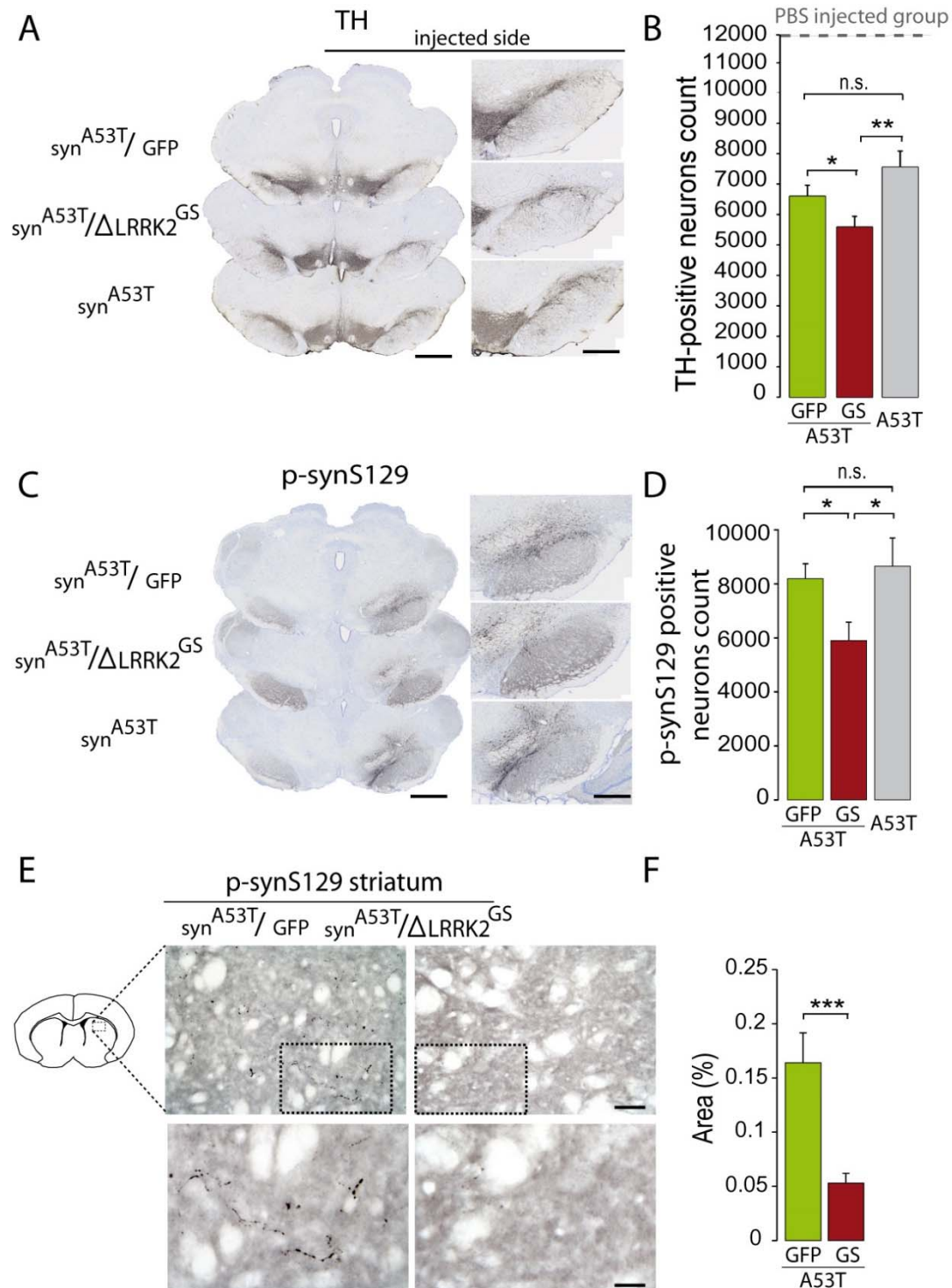
Figures



**Figure 1: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH) at 15 weeks P.I..** (A) The C-terminal fragment of LRRK2 called  $\Delta$ LRRK2 was generated in different forms, WT, G2019S or dead kinase (DK). (B) Biochemical analysis of cells transfected with these  $\Delta$ LRRK2 showed that all three fragments were expressed at similar levels (C-D) These fragments were cloned into an AAV and unilaterally injected into the rat SNpc. Fifteen weeks post-injection, TH immunohistochemistry was performed. The number of TH-positive neurons was evaluated by stereology, revealing no obvious toxicity of the LRRK2 fragments at 15 weeks post-infection. n=10 animal/group. ANOVA and PLSD *post hoc* test. n.s., not significant. Scale bar: 750 $\mu$ m, 400 $\mu$ m.

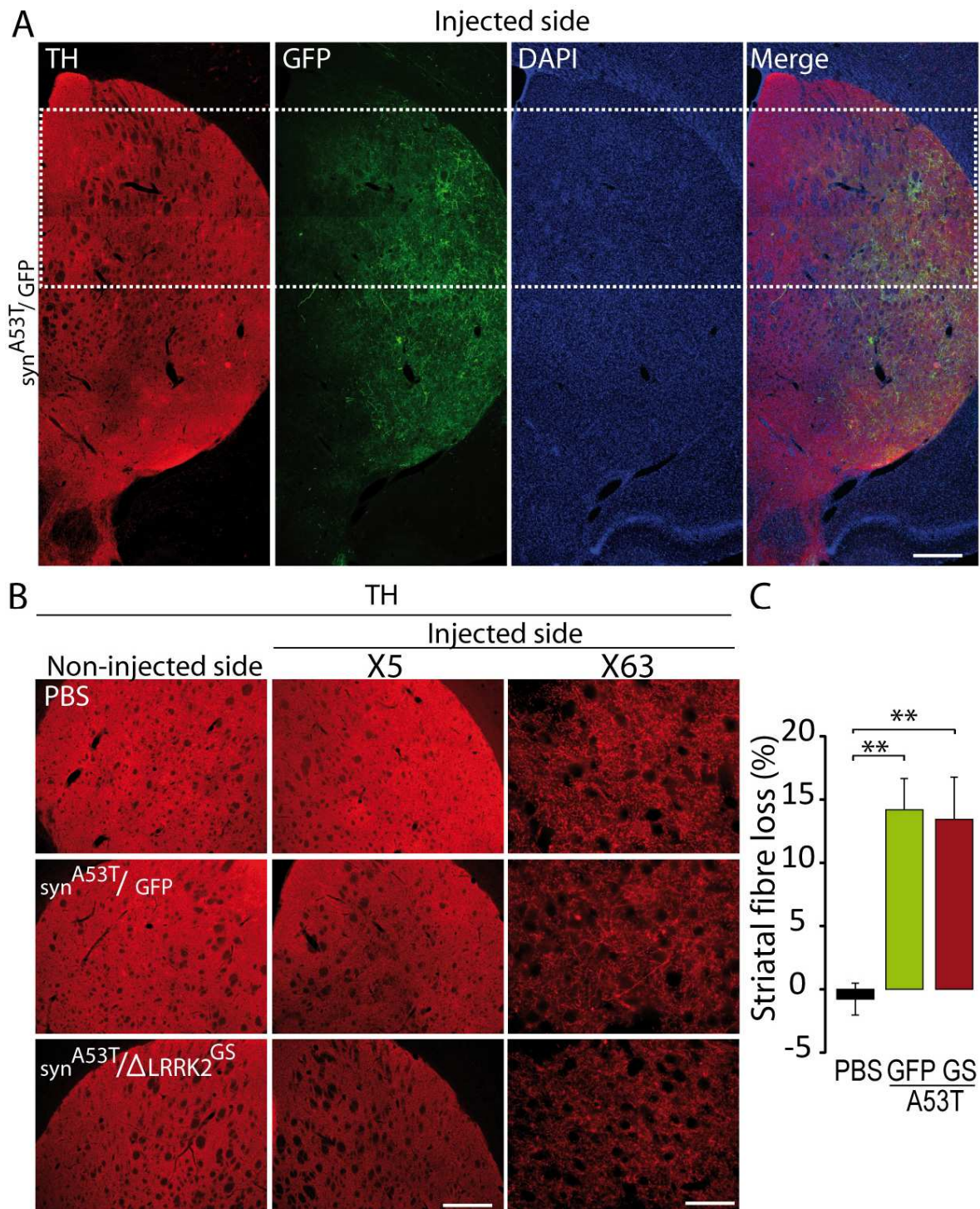


**Figure 2: Histological evaluation of transgenes expression in the SNpc at 15 weeks P.I..** (A) The transduction of  $\alpha$ -syn (in green) was evaluated in the SNpc. A TH staining, in red, was used to identify DA neurons. Scale bar: 500  $\mu\text{m}$ . (B) The number of neurons expressing both  $\alpha$ -syn and  $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$  was measured, higher magnification showed the cytoplasm localization of  $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ . Scale bar 40X: 60  $\mu\text{m}$  , 63X zoom 4: 10  $\mu\text{m}$ .

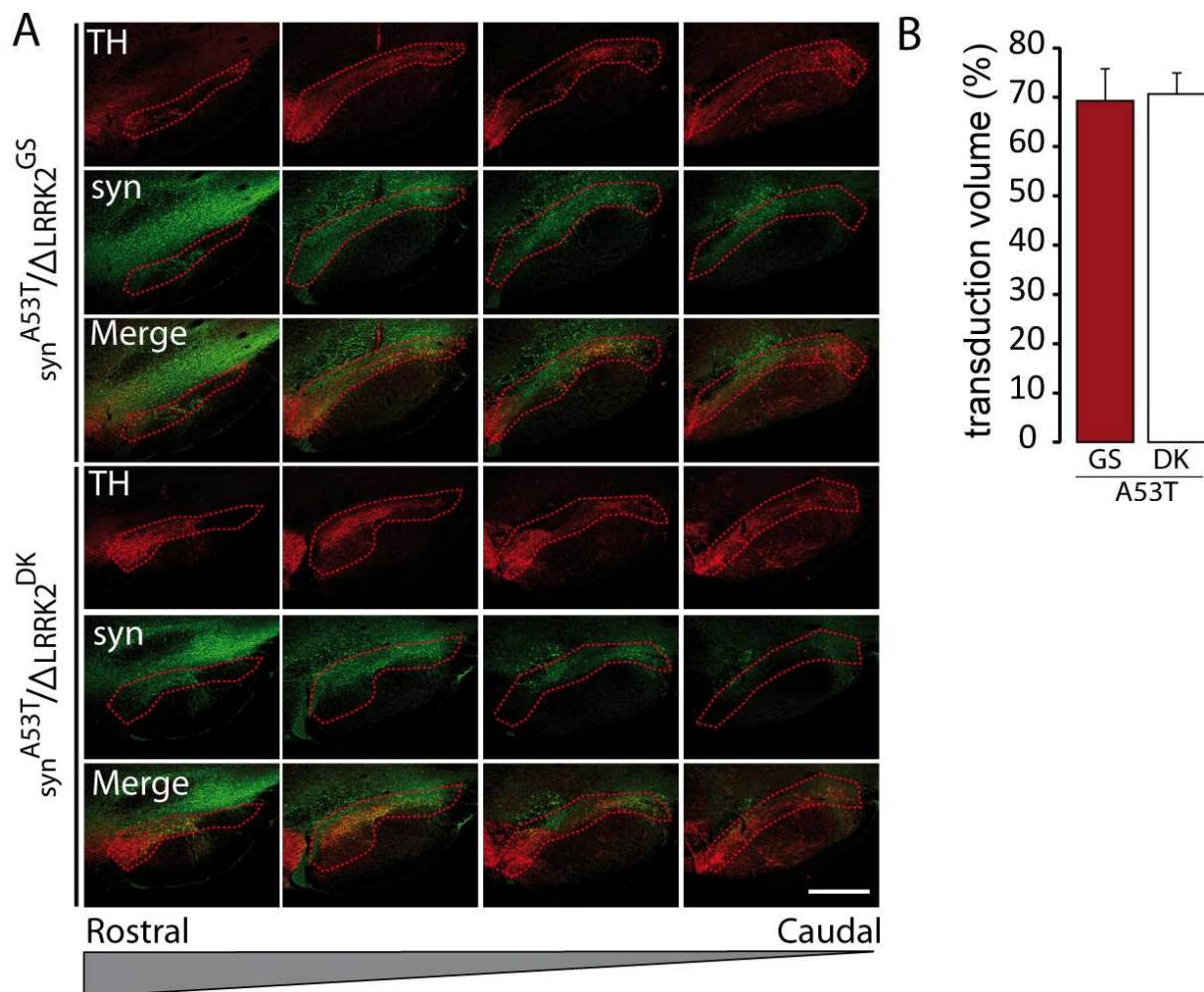


**Figure 3: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH) and phospho- $\alpha$ -synS129 aggregates at 15 weeks P.I.. (A-D) The number of TH-positive and P- $\alpha$ -synS129-positive neurons was evaluated by stereology in the SNpc. Scale bar: 750  $\mu m$ , 400  $\mu m$  (E-F) The percentage of area occupied by the P- $\alpha$ -synS129-positive staining was measured in the striatum at 15 weeks P.I.. n=10 animal/group. ANOVA and PLSD post hoc test. \*, P<0.05; \*\*\*, P<0.001. Scale bar: 200  $\mu m$ , 50  $\mu m$ .**



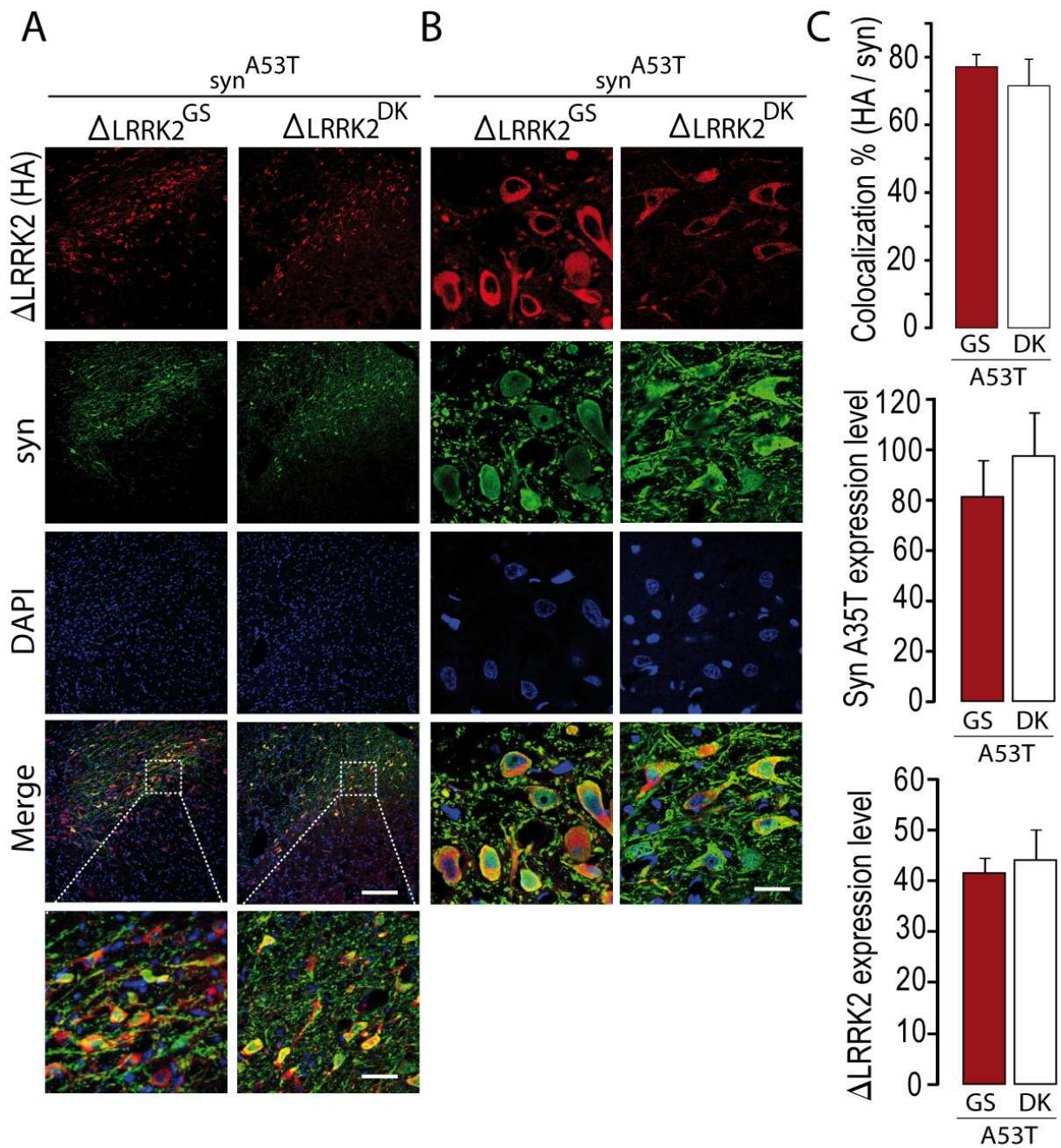


**Figure 4: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum at 15 weeks P.I..** (A) Striatal fiber loss was evaluated in the dorso-medial striatum using TH-immunofluorescence. Scale bar: 1000µm. (B-C) The mean grey value was quantified at the magnification X5. n=10 animal/group. ANOVA and PLSD post hoc test. \*\*, P<0.01 (A-B) scale bar: 1000µm. (B-C) scale bar: 100µm.



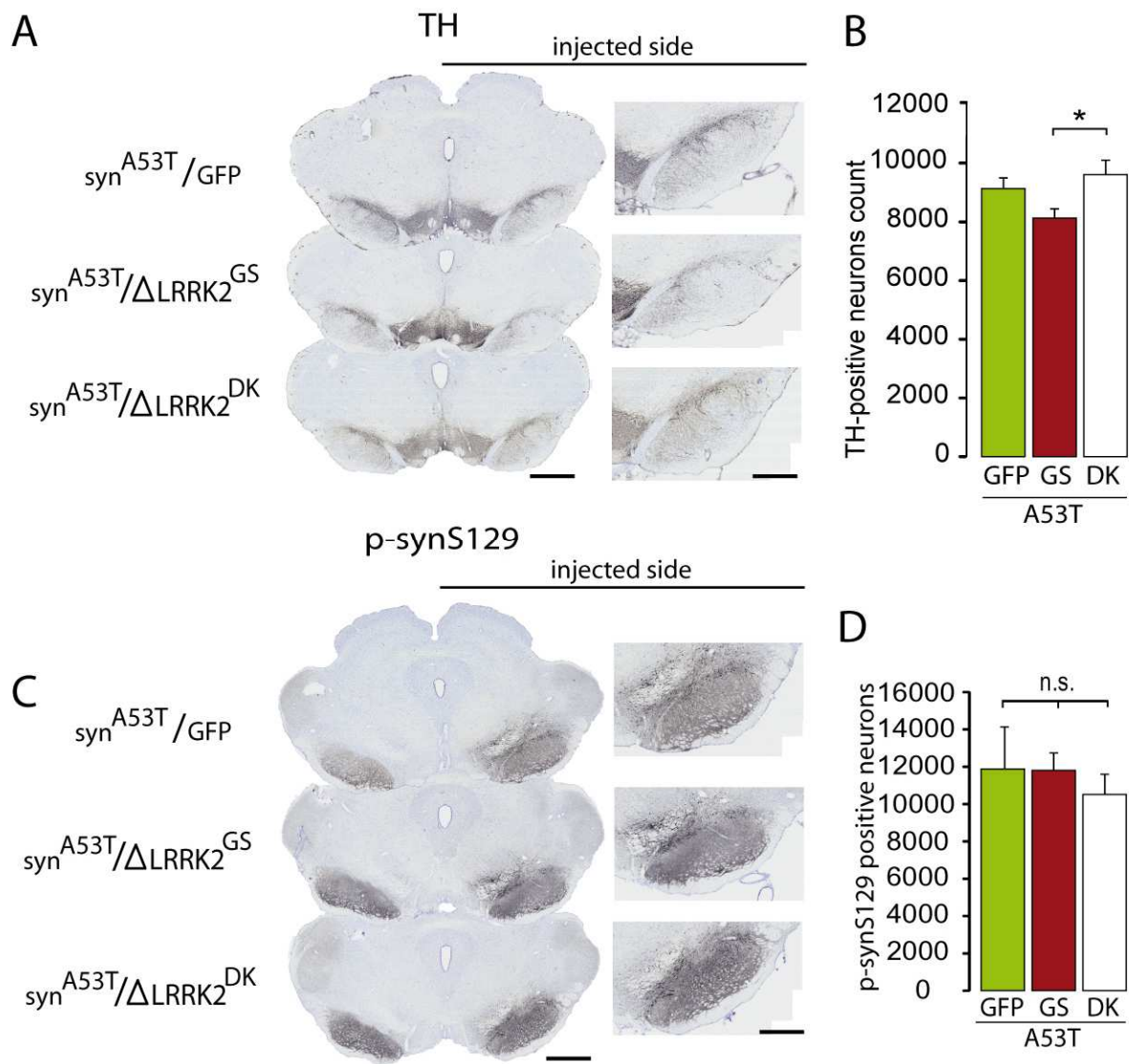
**Figure 5: transduction volume measurement.** (A) The delineation of the SNpc based on the TH staining (in red) was reported on the green channel corresponding to the  $\alpha$ -syn protein to evaluate the transduced volume of the SNpc. Scale bar: 1000 $\mu$ m. (B) The quantification was done on the entire SNpc. n=8 animal/group.





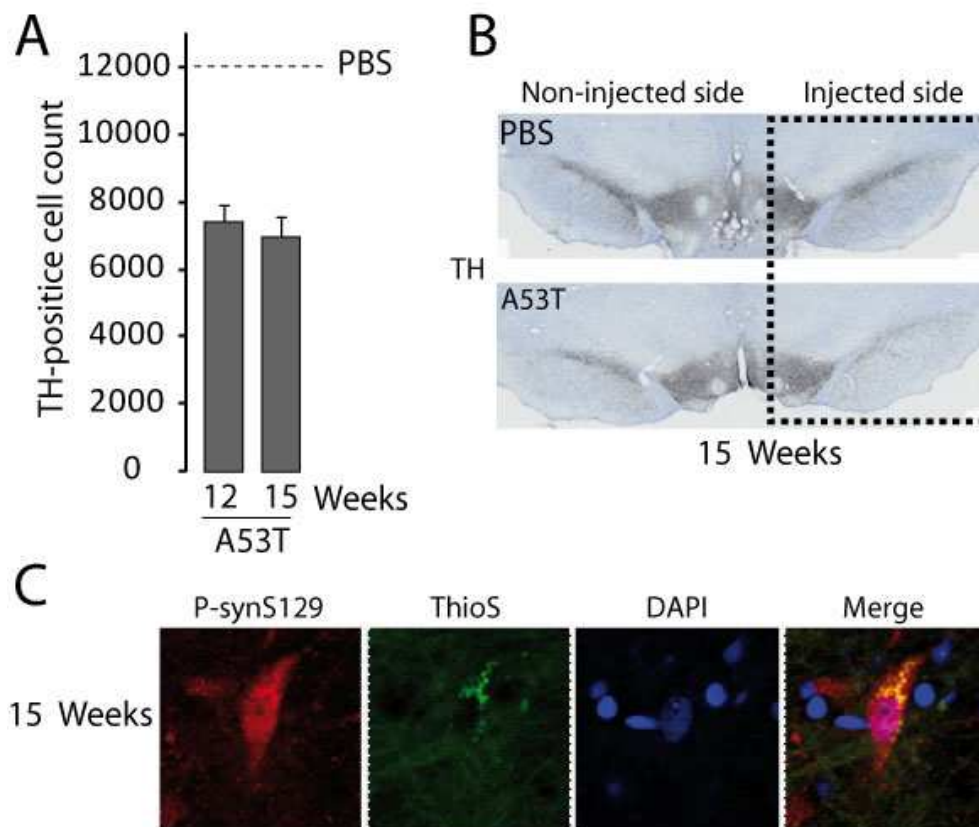
**Figure 6: Colocalization and expression level.** (A-B) At low and high-magnification, double immunofluorescence against HA ( $\Delta$ LRRK2) and  $\alpha$ -syn, showed that the majority of cells co-expressed both transgenes at similar levels. Scale bar: 200  $\mu$ m, magnifications: 50  $\mu$ m, 10 $\mu$ m. (C) The percentage of colocalization, and protein expression levels (mean grey fluorescence) were quantified in the different groups. n=8 animal/group.



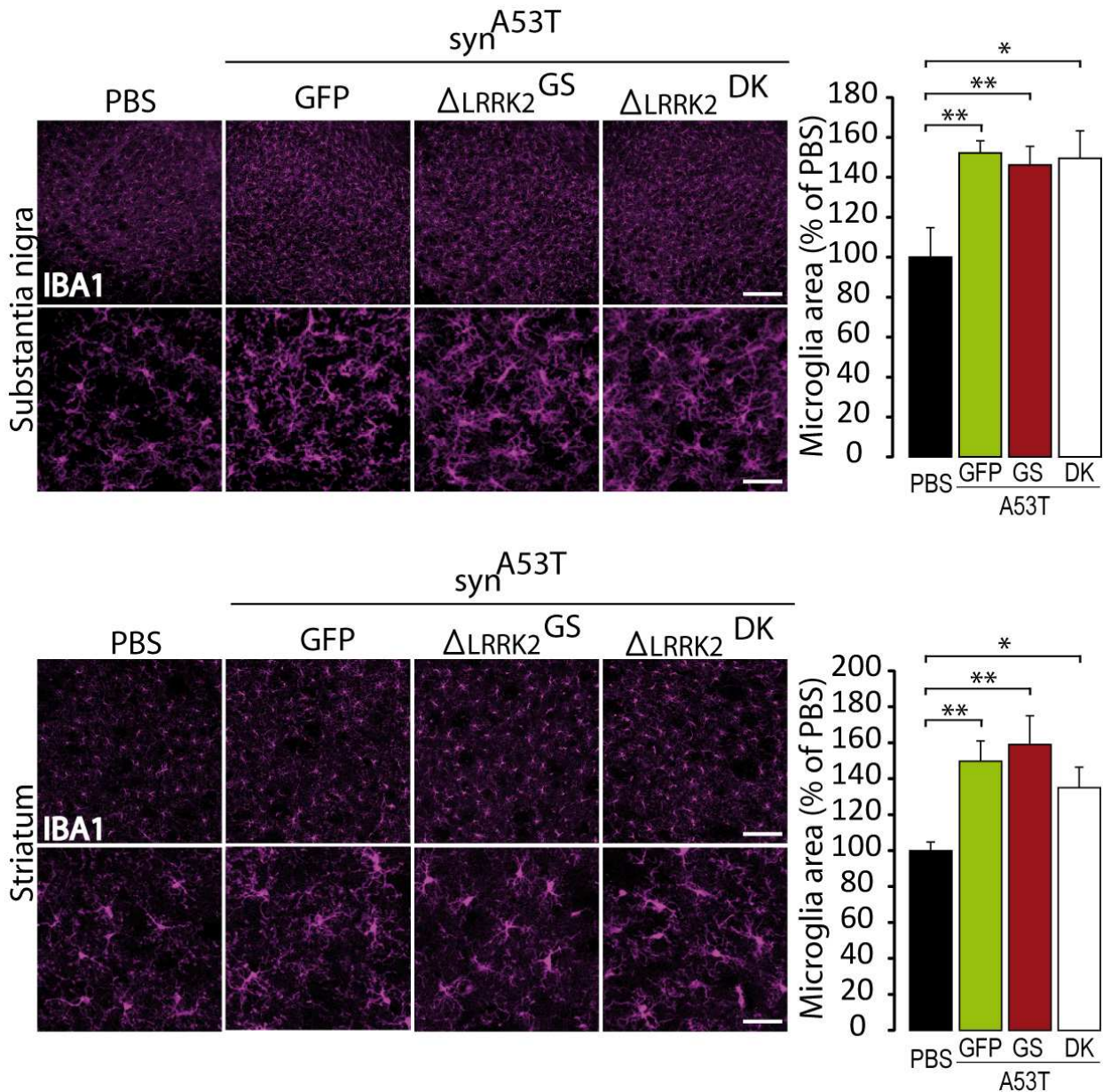


**Figure 7: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH) and phospho- $\alpha$ -synS129 aggregates at 6 weeks post-infection.** (A-D) The numbers of TH-positive and P- $\alpha$ -synS129-positive neurons were evaluated by stereology in the SNpc. n=10 animal/group. ANOVA and PLSD post hoc test. P<0.05. Scale bar: 750 $\mu$ m, 400 $\mu$ m

Supplementary figures



**Supplementary Figure 1.** Results of the pilot experiments carried out to set up the AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> model characterized by partial degeneration of DA neurons in the SNpc of adult rats. AAV- $\alpha$ -syn<sup>A53T</sup> was injected in the SNpc of rats. (A-B) Stereological count of the number of DA neurons in the SNpc, 12 and 15 weeks P.I.. (C) The presence of P- $\alpha$ -syn<sup>S129</sup> and thioflavin S positive aggregates was evaluated at 15 weeks P.I..



**Supplementary Figure 2.** (A-B) The microglial activation (microglia area) was evaluated based on the IBA1 staining in the SNpc and in the striatum (C-D). Results were expressed as percentage of control group (PBS). n=8 animal/group. ANOVA and PLSD post hoc test. P<0.05. Scale bar: 200  $\mu$ m, magnifications: 50  $\mu$ m.

### Acknowledgements

This work was funded by rolling grants from the CEA and the CNRS.

The research generating these results received funding from la Fondation de France (AAP 2010, Engt 00016819 and AAP 2014, Engt 2014-0052580). Noemie Cresto is a recipient of a PhD fellowship from Association France Parkinson (2016).

This work benefited from a support from the national "Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences" (NeurATRIS, "Investissement d'Avenir", ANR-11-INBS-0011).

## Conflict of Interest Statement

All authors declare that they have no conflict of interest

## References

Aurnhammer, Christine, Maren Haase, Nadine Muether, Martin Hausl, Christina Rauschhuber, Ingrid Huber, Hans Nitschko, et al. 2012. « Universal Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Adeno-Associated Virus Serotype 2-Derived Inverted Terminal Repeat Sequences ». *Human Gene Therapy Methods* 23 (1): 18-28. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2011.034>.

Berger, Adeline, Stéphanie Lorain, Charène Joséphine, Melissa Desrosiers, Cécile Peccate, Thomas Voit, Luis Garcia, José-Alain Sahel, et Alexis-Pierre Bemelmans. 2015. « Repair of Rhodopsin mRNA by Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing: A New Approach for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa ». *Molecular Therapy* 23 (5): 918-30. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.11>.

Bieri, Gregor, Michel Brahic, Luc Bousset, Julien Couthouis, Nicholas J. Kramer, Rosanna Ma, Lisa Nakayama, et al. 2019. « LRRK2 Modifies  $\alpha$ -Syn Pathology and Spread in Mouse Models and Human Neurons ». *Acta Neuropathologica* 137 (6): 961-80. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01995-0>.

Biskup, Saskia, et Andrew B. West. 2009. « Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson's disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Parkinson's Disease*, 1792 (7): 625-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.09.015>.

Braak, H., et E. Braak. 2000. « Pathoanatomy of Parkinson's Disease ». *Journal of Neurology* 247 (2): 113-10. <https://doi.org/10.1007/PL00007758>.

Brockmann, Kathrin, Adriane Gröger, Adriana Di Santo, Inga Liepelt, Claudia Schulte, Uwe Klose, Walter Maetzler, et al. 2011. « Clinical and Brain Imaging Characteristics in Leucine-Rich Repeat Kinase 2-Associated PD and Asymptomatic Mutation Carriers ». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 26 (13): 2335-42. <https://doi.org/10.1002/mds.23991>.

Chartier-Harlin, Marie-Christine, Jennifer Kachergus, Christophe Roumier, Vincent Mouroux, Xavier Douay, Sarah Lincoln, Clotilde Levecque, et al. 2004. « Alpha-Synuclein Locus Duplication as a Cause of Familial Parkinson's Disease ». *Lancet (London, England)* 364 (9440): 1167-69. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1).

Cresto, Noémie, Camille Gardier, Francesco Gubinelli, Marie-Claude Gaillard, Géraldine Liot, Andrew B. West, et Emmanuel Brouillet. 2019. « The Unlikely Partnership between LRRK2 and  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease ». *The European Journal of Neuroscience* 49 (3): 339-63. <https://doi.org/10.1111/ejn.14182>.

Cresto, Noemie, Marie-Claude Gaillard, Camille Gardier, Francesco Gubinelli, Elsa Diguët, Déborah Bellet, Laurine Legroux, et al. In press. « The C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation is sufficient to produce neurodegeneration of dopaminergic neurons in vivo ». *Neurobiology of Disease*, Sous presse.

Daher, João P. L., Hisham A. Abdelmotilib, Xianzhen Hu, Laura A. Volpicelli-Daley, Mark S. Moehle, Kyle B. Fraser, Elie Needle, et al. 2015. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates  $\alpha$ -Synuclein Gene-Induced Neurodegeneration ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (32): 19433-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660001>.

Daher, João P. L., Laura A. Volpicelli-Daley, Jonathan P. Blackburn, Mark S. Moehle, et Andrew B. West. 2014. « Abrogation of  $\alpha$ -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (25): 9289-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403215111>.

Daher, João Paulo L., Olga Pletnikova, Saskia Biskup, Alessandra Musso, Sandra Gellhaar, Dagmar Galter, Juan C. Troncoso, et al. 2012. « Neurodegenerative phenotypes in an A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mouse model are independent of LRRK2 ». *Human Molecular Genetics* 21 (11): 2420-31. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds057>.

Deng, Junpeng, Patrick A. Lewis, Elisa Greggio, Eli Sluch, Alexandra Beilina, et Mark R. Cookson. 2008. « Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1499-1504. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709098105>.

Di Maio, Roberto, Eric K. Hoffman, Emily M. Rocha, Matthew T. Keeney, Laurie H. Sanders, Briana R. De Miranda, Alevtina Zharikov, et al. 2018. « LRRK2 Activation in Idiopathic Parkinson's Disease ». *Science Translational Medicine* 10 (451): eaar5429. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar5429>.

Dusonchet, Julien, Olexiy Kochubey, Klodjan Stafa, Samuel M. Young, Romain Zufferey, Darren J. Moore, Bernard L. Schneider, et Patrick Aebischer. 2011. « A Rat Model of Progressive Nigral Neurodegeneration Induced by the Parkinson's Disease-Associated G2019S Mutation in LRRK2 ». *The Journal of Neuroscience* 31 (3): 907-12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5092-10.2011>.

Giasson, Benoit I., Jason P. Covy, Nancy M. Bonini, Howard I. Hurtig, Matthew J. Farrer, John Q. Trojanowski, et Vivianna M. Van Deerlin. 2006. « Biochemical and Pathological Characterization of Lrrk2 ». *Annals of Neurology* 59 (2): 315-22. <https://doi.org/10.1002/ana.20791>.

Gilks, William P, Patrick M Abou-Sleiman, Sonia Gandhi, Shushant Jain, Andrew Singleton, Andrew J Lees, Karen Shaw, et al. 2005. « A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease ». *The Lancet* 365 (9457): 415-16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17830-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17830-1).

Gloeckner, Christian Johannes, Norbert Kinkl, Annette Schumacher, Ralf J. Braun, Eric O'Neill, Thomas Meitinger, Walter Kolch, Holger Prokisch, et Marius Ueffing. 2006. « The Parkinson Disease Causing LRRK2 Mutation I2020T Is Associated with Increased Kinase Activity ». *Human Molecular Genetics* 15 (2): 223-32. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi439>.

Greggio, Elisa, Shushant Jain, Ann Kingsbury, Rina Bandopadhyay, Patrick Lewis, Alice Kaganovich, Marcel P. van der Brug, et al. 2006. « Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin ». *Neurobiology of Disease* 23 (2): 329-41. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.04.001>.

Greggio, Elisa, Ibarbo Zambrano, Alice Kaganovich, Alexandra Beilina, Jean-Marc Taymans, Veronique Daniëls, Patrick Lewis, et al. 2008. « The Parkinson Disease-Associated Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (24): 16906-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708718200>.

Healy, Daniel G, Mario Falchi, Sean S O'Sullivan, Vincenzo Bonifati, Alexandra Durr, Susan Bressman, Alexis Brice, et al. 2008. « Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study ». *The Lancet Neurology* 7 (7): 583-90. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70117-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70117-0).

Ito, Genta, et Takeshi Iwatsubo. 2012. « Re-Examination of the Dimerization State of Leucine-Rich Repeat Kinase 2: Predominance of the Monomeric Form ». *Biochemical Journal* 441 (3): 987-98. <https://doi.org/10.1042/BJ20111215>.

Krüger, Rejko, Wilfried Kuhn, Thomas Müller, Dirk Voitalla, Manuel Graeber, Sigfried Kösel, Horst Przuntek, Jörg T. Epplen, Ludger Schols, et Olaf Riess. 1998. « AlaSOPro Mutation in the Gene Encoding  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease ». *Nature Genetics* 18 (2): 106-8. <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>.

Lee, Byoung Dae, Joo-Ho Shin, Jackalina VanKampen, Leonard Petrucelli, Andrew B. West, Han Seok Ko, Yun Lee, et al. 2010. « Inhibitors of Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Protect Against LRRK2-Models of Parkinson's Disease ». *Nature medicine* 16 (9): 998-1000. <https://doi.org/10.1038/nm.2199>.

Lesage, Suzanne, et Alexis Brice. 2009. « Parkinson's Disease: From Monogenic Forms to Genetic Susceptibility Factors ». *Human Molecular Genetics* 18 (R1): R48-59. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp012>.

Lin, Xian, Loukia Parisiadou, Xing-Long Gu, Lizhen Wang, Hoon Shim, Lixin Sun, Chengsong Xie, et al. 2009. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates the Progression of Neuropathology Induced by Parkinson's-Disease-Related Mutant Alpha-Synuclein ». *Neuron* 64 (6): 807-27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.006>.

Lobbestael, E., L. Civiero, T. De Wit, J.-M. Taymans, E. Greggio, et V. Baekelandt. 2016. « Pharmacological LRRK2 Kinase Inhibition Induces LRRK2 Protein Destabilization and Proteasomal Degradation ». *Scientific Reports* 6 (septembre): 33897. <https://doi.org/10.1038/srep33897>.

Maekawa, Tatsunori, Toshikuni Sasaoka, Sadahiro Azuma, Takafumi Ichikawa, Heather L. Melrose, Matthew J. Farrer, et Fumiya Obata. 2016. « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Regulates  $\alpha$ -Synuclein Clearance in Microglia ». *BMC Neuroscience* 17 (1): 77. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0315-2>.

Melrose, H. L., J. C. Dächsel, B. Behrouz, S. J. Lincoln, M. Yue, K. M. Hinkle, C. Kent, et al. 2010. « Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice ». *Neurobiology of disease* 40 (3): 503-17. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.07.010>.

Novello, Salvatore, Ludovico Arcuri, Sandra Dovero, Nathalie Duthel, Derya R. Shimshek, Erwan Bezdard, et Michele Morari. 2018. « G2019S LRRK2 mutation facilitates  $\alpha$ -synuclein neuropathology in aged mice ». *Neurobiology of Disease* 120 (June): 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.08.018>.

Oosterveld, Linda P., John C. Allen, Ebonne Y. L. Ng, Soo-Hoon Seah, Kay-Yaw Tay, Wing-Lok Au, Eng-King Tan, et Louis C. S. Tan. 2015. « Greater Motor Progression in Patients with Parkinson Disease Who Carry LRRK2 Risk Variants ». *Neurology* 85 (12): 1039-42. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001953>.

Paisán-Ruíz, Coro, Shushant Jain, E. Whitney Evans, William P. Gilks, Javier Simón, Marcel van der Brug, Adolfo López de Munain, et al. 2004. « Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease ». *Neuron* 44 (4): 595-600. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.023>.

Polymeropoulos, Mihael H., Christian Lavedan, Elisabeth Leroy, Susan E. Ide, Anindya Dehejia, Amalia Dutra, Brian Pike, et al. 1997. « Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease ». *Science* 276 (5321): 2045-47. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.

Ramonet, David, João Paulo L. Daher, Brian M. Lin, Klodjan Stafa, Jaekwang Kim, Rebecca Banerjee, Marie Westerlund, et al. 2011. « Dopaminergic Neuronal Loss, Reduced Neurite Complexity and Autophagic Abnormalities in Transgenic Mice Expressing G2019S Mutant LRRK2 ». *PLoS ONE* 6 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018568>.

Rosenbusch, Katharina E., et Arjan Kortholt. 2016. « Activation Mechanism of LRRK2 and Its Cellular Functions in Parkinson's Disease ». *Parkinson's Disease* 2016: 7351985. <https://doi.org/10.1155/2016/7351985>.

Russo, Isabella, Luigi Bubacco, et Elisa Greggio. 2014. « LRRK2 and neuroinflammation: partners in crime in Parkinson's disease? » *Journal of Neuroinflammation* 11 (mars): 52. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-52>.

Saito, Yuko, Akiko Kawashima, Nyoka N. Ruberu, Hideo Fujiwara, Shunichi Koyama, Motoji Sawabe, Tomio Arai, et al. 2003. « Accumulation of Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein in Aging Human Brain ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 62 (6): 644-54. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.6.644>.

Sheng, Zejuan, Shuo Zhang, Daisy Bustos, Tracy Kleinheinz, Claire E. Le Pichon, Sara L. Dominguez, Hilda O. Solanoy, et al. 2012. « Ser1292 Autophosphorylation Is an Indicator of LRRK2 Kinase Activity and Contributes to the Cellular Effects of PD Mutations ». *Science Translational Medicine* 4 (164): 164ra161-164ra161. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004485>.

Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, et al. 2003. « Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5646): 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>.

Smith, Wanli W., Zhong Pei, Haibing Jiang, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, et Christopher A. Ross. 2006. « Kinase Activity of Mutant LRRK2 Mediates Neuronal Toxicity ». *Nature Neuroscience* 9 (10): 1231-33. <https://doi.org/10.1038/nn1776>.

Volpicelli-Daley, Laura A., Hisham Abdelmotilib, Zhiyong Liu, Lindsay Stoyka, João Paulo Lima Daher, Austen J. Milnerwood, Vivek K. Unni, et al. 2016. « G2019S-LRRK2 Expression Augments  $\alpha$ -Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 36 (28): 7415-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3642-15.2016>.



West, Andrew B., Darren J. Moore, Catherine Choi, Shaida A. Andrabi, Xiaojie Li, Dustin Dikeman, Saskia Biskup, et al. 2007. « Parkinson's Disease-Associated Mutations in LRRK2 Link Enhanced GTP-Binding and Kinase Activities to Neuronal Toxicity ». *Human Molecular Genetics* 16 (2): 223-32. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl471>.

Yahalom, Gilad, Yael Orlev, Oren S. Cohen, Evgenia Kozlova, Eitan Friedman, Rivka Inzelberg, et Sharon Hassin-Baer. 2014. « Motor Progression of Parkinson's Disease with the Leucine-Rich Repeat Kinase 2 G2019S Mutation: Disease Progression in PD with G2019S Mutation ». *Movement Disorders* 29 (8): 1057-60. <https://doi.org/10.1002/mds.25931>.

Zarranz, Juan J., Javier Alegre, Juan C. Gómez-Esteban, Elena Lezcano, Raquel Ros, Israel Ampuero, Lídice Vidal, et al. 2004. « The New Mutation, E46K, of  $\alpha$ -Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia ». *Annals of Neurology* 55 (2): 164-73. <https://doi.org/10.1002/ana.10795>.

Zimprich, Alexander, Saskia Biskup, Petra Leitner, Peter Lichtner, Matthew Farrer, Sarah Lincoln, Jennifer Kachergus, et al. 2004. « Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology ». *Neuron* 44 (4): 601-7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>.

**Titre :** Etude de la coopération de l'alpha-synucléine et de LRRK2 dans les dysfonctions mitochondriales dans la Maladie de Parkinson

**Mots clés :** Maladie de Parkinson, LRRK2, alpha-synucléine, mitochondrie, culture neuronale, imagerie cellulaire

**Résumé :** Les protéines alpha-synucléine ( $\alpha$ syn) et «Leucine-Rich Repeat Kinase 2» (LRRK2), jouent toutes deux un rôle majeur dans la physiopathologie des formes sporadiques et génétiques de la maladie de Parkinson (MP). En particulier, la mutation G2019S de LRRK2, située dans son domaine kinase, est la cause la plus fréquente de formes génétiques de la MP. Il a été suggéré que l' $\alpha$ syn et LRRK2 agirait de concert pour induire la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) dans cette maladie. Dans notre laboratoire, il a été montré qu'en effet LRRK2 G2019S pouvait potentialiser la mort des neurones dopaminergiques induite par l' $\alpha$ syn dans la SNpc de rats, confirmant l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les deux protéines. De plus, il est connu depuis plusieurs années que les dysfonctionnements mitochondriaux joueraient un rôle central dans la MP. De nombreuses études ont montré que les deux protéines individuellement pouvaient entraîner des dysfonctionnements de cet organelle. Notre hypothèse est donc que l'interaction fonctionnelle entre l' $\alpha$ syn et LRRK2 pourrait passer par une action commune sur la mitochondrie. Nous avons ainsi pu montrer *in vitro*, dans des cultures primaires de neurones

de rat surexprimant l' $\alpha$ syn et LRRK2, que LRRK2 G2019S, mais pas sa forme sauvage (WT) ni sa forme sans activité kinase (DK, Dead Kinase) augmentait significativement le nombre de neurones présentant un marquage pathologique de l' $\alpha$ syn (phospho-S129), sans induire de mort cellulaire. Au niveau cellulaire et moléculaire, une diminution significative du taux de production d'ATP mitochondrial a été mise en évidence dans les cellules co-exprimant LRRK2 (WT, G2019S, et encore plus DK) avec l' $\alpha$ syn par rapport à celles exprimant l' $\alpha$ syn seule, ceci sans différence dans la quantité totale d'ATP. Les mitochondries des neurones co-exprimant LRRK2 et l' $\alpha$ syn parcouraient également de plus longues distances le long des neurites que celles des neurones exprimant uniquement l' $\alpha$ syn. Pour résumer, dans ce modèle *in vitro*, LRRK2 augmente donc l'accumulation somatique d'une forme pathologique de l' $\alpha$ syn, d'une manière dépendante de son activité kinase. Dans ces conditions, les mitochondries sont capables de maintenir leur homéostasie, notamment en adaptant leur production d'ATP. Cela semble indiquer l'existence d'un stress mitochondrial modéré, induit par la co-expression de l' $\alpha$ syn et de LRRK2.

**Title :** Alpha-synuclein and LRRK2's cooperation in mitochondrial dysfunctions in Parkinson's Disease

**Keywords :** Parkinson's Disease, LRRK2, alpha-synuclein, mitochondria, neuronal culture, cellular imaging

**Abstract :** The proteins alpha-synuclein ( $\alpha$ syn) and Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) both play major roles in the physiopathology of sporadic and genetic forms of Parkinson's Disease (PD). In particular, the G2019S mutation of LRRK2, located in its kinase domain, is the most prevalent cause of genetic forms of PD. It has been suggested that  $\alpha$ syn and LRRK2 could act together to induce the selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in the pathogenesis of this disease. In our laboratory, it has been shown that G2019S LRRK2 could increase the dopaminergic cell loss induced by  $\alpha$ syn in the SNpc of rats, confirming the existence of a functional interaction between the two proteins. Moreover, it has been known for years that mitochondrial dysfunction played a major role in PD. Many studies showed that both LRRK2 and  $\alpha$ syn induced mitochondrial dysfunction. Therefore, we hypothesized that the functional interaction between  $\alpha$ syn and LRRK2 could take place through a common effect on mitochondria.

We showed *in vitro*, in primary rat neurons, that G2019S LRRK2, but not the wild type (WT) form nor the dead kinase mutant (DK), significantly increased the number of neurons expressing a pathological form of  $\alpha$ syn (phospho-S129). This was not associated with any cell loss. At the cellular and molecular levels, there was a significant decrease in the mitochondrial ATP production rate in cells co-expressing LRRK2 (WT, G2019S and even more pronounced with DK) with  $\alpha$ syn, without any change in total ATP levels. The mean distance travelled by mitochondria along neurites was higher in neurons co-expressing  $\alpha$ syn and LRRK2 than in neurons only expressing  $\alpha$ syn. To summarize, in this *in vitro* model LRRK2 increases the somatic accumulation of a pathologic form of  $\alpha$ syn, in a kinase-dependent manner. In these conditions, mitochondria are able to maintain their homeostasis, in particular by adapting their ATP production rate. This seems to indicate a moderate mitochondrial stress induced by the co-expression of  $\alpha$ syn and LRRK2.

