



HAL
open science

Etude de l'impact de la sur-expression de la partie C-terminale de LRRK2 mutée G2019S dans les neurones dopaminergiques de la substance noire.

Noemie Cresto

► To cite this version:

Noemie Cresto. Etude de l'impact de la sur-expression de la partie C-terminale de LRRK2 mutée G2019S dans les neurones dopaminergiques de la substance noire.. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLS112 . tel-03689120

HAL Id: tel-03689120

<https://theses.hal.science/tel-03689120>

Submitted on 7 Jun 2022

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.

NNT : 2017SACLAS112

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°568 : **signalisations et réseaux intégratifs en biologie**

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

Mlle Noémie Cresto

Etude de l'impact de la sur-expression de la partie C-terminale de LRRK2 mutée
G2019S dans les neurones dopaminergiques de la substance noire.

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-roses, le 6 juin 2017:

Composition du Jury :

Dr, Hervé, Daniel	Directeur de recherche, CNRS Université Paris-Saclay	Président
Dr, Jean-Marc, Taymans	Directeur de recherche, INSERM Université Lille 2	Rapporteur
Dr, Benjamin, Dehay	Chargé de recherche, CNRS Université de Bordeaux	Rapporteur
Dr, Bernard, Schneider	Directeur de recherche, Brain Mind Institute, EPFL	Examineur
Dr, Emmanuel, Brouillet	Directeur de recherche, CNRS Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

Remerciements

Il me sera impossible de tous vous remercier à la hauteur de votre contribution à ce travail, à cette histoire. Vous avez chacun d'entre vous marqué définitivement ma vie scientifique et personnelle, et pour tous ces petits moments de vie, je tenais à vous exprimer un immense merci.

Je remercie Jean-Marc Taymans et Benjamin Dehay, mes rapporteurs, Bernard Schneider, examinateur, et Hervé Daniel, président du jury, d'avoir accordé de leur temps pour lire mon manuscrit. Je suis honorée de votre présence au sein de mon jury de thèse. Un merci tout particulier à Jean-Marc Taymans pour son suivi très actif tout du long de ma thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Emmanuel Brouillet, pour m'avoir accordé sa confiance pendant ces trois ans et demi. La thèse à vos côtés m'a fait grandir, j'ai tellement appris. Merci pour toutes les responsabilités que vous m'avez confié.

Merci à MIRCen, en particulier à Philippe Hantraye de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans un cadre exceptionnel, travailler à MIRCen est une expérience formidable.

Je remercie Gilles Bonvento, Carole Escartin, Géraldine Liot, Frédéric Ducongé, Che Serguera, Marc Dhenain, Jérôme Braudeau, Sandro Alves et Alexis Bemelmans pour tous vos conseils avisés.

Je remercie tous les « copains thésards »,

Chloé, Marie-Anne, Lucile, Laëtitia, Juliette, Mickaël, Ioanna, Romain, Brice, Yaël, Marie, Charlotte, Nam, qui vivent maintenant leur vie loin de MIRCen.

Kelly, Séverine, Clémence, Jérémy, ZhenZhen. Tenez bon les gars, vous y êtes presque!!

Marianne, Laurene, Lucie, Audrey, la « petite Clémence », Clément, Benoit. C'est le moment de tout donner !!

Les poussins, Camille, Francesco, Pauline, Alix et Anastasie à qui je souhaite une thèse aussi riche que la mienne.

Les poussinoux, Océane, Charlotte, Suzanne, Louis et Pierre-Antoine, à qui je souhaite de pouvoir continuer leur histoire à MIRCen. Lauriane, à qui je souhaite de s'épanouir dans son futur métier.

Merci à la team 1, Gilles Bonvento, Emmanuel Brouillet, Carole Escartin, Géraldine Liot, Julien Valette, Julien Flament, Pierrick Jego, Edwin Hernandez Garzon, Maria Carillo Conesa, et ex-membres de la team 1, Marco Palombo, Aurélie Berniard et tous les étudiants déjà cités plus haut pour les nombreux échanges au cours de nos réunions team 1.

Merci à ma team d'adoption !! Un merci tout particulier à Marie-claude Gaillard et Charlène Joséphine, pour leur aide à de nombreuses reprises. Marie-Claude, tu m'as transmis le « bébé LRRK2 », merci d'avoir été présente à chaque moment important, je sais que tu n'aimes pas qu'on te le dise mais tu es une véritable maman pour nous !! Charlène, merci pour ton aide et surtout ta bonne humeur lors de nos longues journées de manips. Tu es un rayon de soleil à MIRCen.

Le projet LRRK2 a nécessité l'aide d'un nombre important de personnes que je souhaite très vivement remercier :

Alexis Bemelmans, Noëlle Dufour, Gwenaëlle Auregan, et Charlène Joséphine pour la production de mes outils de travail !!

Toute la team injection stéréotaxique, Marie-Claude Gaillard, Charlène Joséphine, Gwenaëlle Auregan, Martine Guillermier, Diane Houitte, Suéva Bernier, Mylène Gaudin pour ces longues journées en A2.

Karine Cambon, et Julien Mitja de faire si bien tourner la plateforme de comportement rongeur. Merci Karine d'avoir fait craquer le porte-monnaie pour les rotamètres ! Merci Julien pour ton aide à mon arrivée. Merci à Jean-Marie Helies et aux animaliers.

La team histologie, Caroline Jan, Fanny Petit et Pauline Gipchtein pour leur aide technique mais aussi pour leurs nombreux conseils. Caroline, Pauline, bon courage pour la fin de vos comptages stéréologiques !! Pour moi c'est fini, hihhi !!

Madame Axio-scan, Anne-Sophie Hérard, pour avoir si souvent accepté de scanner mes lames pour hier... Tu as rendu mes journées de comptage beaucoup plus poétiques ! Merci pour tes nombreux conseils équestres.

Merci à Lev Stimmer et Maria Carillo Conesa pour leurs nombreux conseils. Merci à Yann Bramouille, monsieur ATP32, et Nadja Van Camp, pour leurs conseils.

Merci à l'équipe technique, Laurent Vincent, Pascal Wodling, Aude Biaut, Kristell Bastide, Didier Thenadey de faire tourner MIRCen.

Merci à Marie-Christine Courbeix, Marie-Laure Manenti et Cécile Saintot pour leur aide administrative.

Sans oublier, Elsa Diguët, Laurine Legroux et Déborah Bellet qui ont travaillé avant moi sur le projet.

Enfin, merci à Liliane Kamgue, Daniela Molina et Camille Gardier pour avoir servi de cobaye. J'ai beaucoup appris avec vous.

Ma thèse n'aurait pas été si facile à vivre tous les jours sans la présence d'un nombre important de personnes, merci pour votre présence quotidienne.

Merci à Laurent Surdi, secrétaire de l'ED Biosigne, pour son aide à chaque douloureuse étape administrative (je pense notamment aux inscriptions...).

Un merci tout particulier à Lucile et Laëtitia pour leur accueil dans le bureau 210B et pour toutes les discussions et les conseils scientifiques ou non scientifiques qui m'ont permis de débiter ma thèse dans un contexte très favorable !

Merci à mes « coupines de bureau », Kelly, Séverine, Laurene, pour leurs nombreux «pétage de câbles», souvent à partir de 17H qui font que les longues soirées au bureau passent bien plus vite !! Séverine, Laurene vous aller devoir composer encore un peu avec les goûts musicaux de Kelly la DJette...Pardon à nos voisins de bureau, les murs ne sont pas épais... *Feel the magic in the air, allez, aller, aller, levez les mains en l'air, allez, aller, aller!!* Nos discussions bureau vont me manquer. Séverine, je suis sûre que tu trouveras ta voie et que tu feras de grandes choses, je n'en ai aucun doute. Kelly, Laurene, vous m'avez presque convaincu que les astrocytes sont importants...presque ! Merci les filles pour votre gentillesse, vos petites attentions, vos tacles. Vous êtes de très belles personnes et je suis heureuse d'avoir partagé ses trois ans avec vous.

Merci à mes « mamanS », elles se reconnaîtront...n'est-ce pas Marianne ? « Va au médecin », « mange », « mais qu'est-ce que tu manges ? », « rentre chez toi »...Vous avez bien pris soin de moi, même si je ne vous ai pas souvent écouté !!

Merci à Audrey de m'avoir soutenu à Vienne !!

Merci à Lucie, Dimitri et mon petit poussin Camille pour m'avoir si bien détendu à Bordeaux !! Camille si j'ai un conseil à te donner, ne parle plus après 19 heures... J'ai découvert une nouvelle Lucie à Bordeaux, le vin blanc sucré en est la clé !!

Camille, mon poussin, ça a été un réel plaisir de travailler à tes côtés. Tu es brillante, un peu folle mais brillante. Je te lègue, contrainte et forcée, toutes mes affaires, fais-en bon usage !

Camille, Géraldine, prenez soin du bébé LRRK2, je suis certaine qu'il est entre de bonnes mains avec vous.

Géraldine, je te souhaite beaucoup de courage pour supporter qui tu sais...

Marianne, merci pour ta gentillesse, et tes petits sourires.

Clémence, garde cette joie de vivre qui te caractérise !! Je te souhaite beaucoup de réussite.

Sonia, merci d'avoir su me distraire dans l'avion pour le retour de Vienne.

Charlotte, Marie, Yaël, ma petite famille du labo. En débutant ma thèse jamais je n'aurais pensé rencontrer des gens aussi barrés que vous !!! Merci infiniment d'avoir été présents pendant ses trois ans et demi au labo mais surtout en dehors. Vous avez grandement contribué à ma santé mentale. Merci pour tous ces moments, déjeuners, pauses café, bars, soirées, vacances... Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Yaël, ma voix de la raison, on n'a jamais eu besoin de se parler pour se comprendre. Notre amitié est « gravée dans la roche ». Marie, je vais me souvenir longtemps de ces moments en biochimie sous fond de Stromae, de tes petites danses sous la pluie porte d'Orléans, de ton traiteur italien !! Tu es tellement généreuse, merci d'être tout simplement mon amie. Charlotte, mon soleil, ma lumière du matin. Ne change jamais, tu es une personne extraordinaire, sortie d'une autre planète... J'ai eu une chance inouïe de vous rencontrer. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite et j'espère que nous allons continuer encore longtemps notre bout de chemin ensemble.

Et parce que la thèse n'a pas été le commencement de l'histoire,

Je tiens à remercier Gilles Huberfeld pour m'avoir mis le pied à l'étrier. Tu as été le premier à me faire confiance et à me donner confiance en moi, tu n'imagines pas toutes les choses que j'ai appris à ton contact.

Je remercie Roseline Poirier, Jean-Jacques Benoliel et Christel Becker, pour avoir cru en moi en master et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes stages avec vous.

Vous avez grandement contribué à tous mes choix scientifiques, apprendre à vos côtés a été un réel plaisir.

Aurélie, Pierre, merci d'avoir sacrifié votre weekend de Pâques pour relire et corriger ma thèse. Votre aide a été précieuse. Lucile, Alex, merci pour les nombreuses soirées sushis.

Merci à mes parents et leur soutien sans faille même à distance. Merci à ma sœur pour sa sagesse, tu es un modèle de réussite pour moi. Je remercie mes beaux-parents, ma belle-sœur et mes beaux-frères pour leur présence à chaque moment. Enfin merci à mes nièces et neveux d'égayer ma vie.

Merci à mon double, mon pilier, ma boussole, d'être toujours présent à mes côtés depuis toutes ces années et de m'accompagner dans toutes mes aventures, franchement je ne sais pas comment tu fais. J'ai conscience que sans toi rien n'aurait été possible. Merci de prendre soin de moi et de nos « bébés » à poils ou à plumes.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	5
Liste des figures et tables	9
Liste des abréviations	11
Introduction	1
1 La maladie de Parkinson	1
1.1 Généralités	1
1.1.1 Historique.....	1
1.1.2 Epidémiologie de la MP en quelques chiffres.....	2
1.1.3 Aspects cliniques et diagnostic.....	2
1.2 Anatomie Pathologique	3
1.2.1 Le système dopaminergique.....	3
1.2.1.1 Les ganglions de la base.....	3
1.2.1.2 Synthèse et métabolisme de la dopamine.....	5
1.2.1.3 L'atteinte du système dopaminergique dans la MP.....	7
1.2.2 Corps de Lewy.....	8
1.3 Etiologie	10
1.3.1 Sporadiques.....	10
1.3.2 Formes génétiques.....	10
1.3.2.1 Leucin-rich repeat kinase 2 (LRRK2).....	12
1.3.2.2 Synucleine.....	13
1.4 Traitements	14
1.4.1 Les traitements médicamenteux.....	14
1.4.2 Les traitements non médicamenteux.....	16
1.4.3 Les nouvelles pistes de traitements.....	17
1.4.3.1 La thérapie génique.....	17
1.4.3.2 La greffe de cellules souches.....	18
1.4.3.3 L'immunothérapie synucléine.....	18
1.5 Physiopathologie de la MP	19
1.5.1 Neuroinflammation.....	20
1.5.2 Dysfonction mitochondriale.....	20
1.5.3 Dysfonction Autophagie/protéasome.....	21
1.5.4 Le métabolisme de la dopamine.....	21
2 Synucléine	26
2.1 Les différents domaines et leurs fonctions	26
2.1.1 Les différents domaines.....	26
2.1.2 Les modifications Post-traductionnelles.....	27
2.1.2.1 Sites de phosphorylation.....	27

2.1.2.2	Troncation.....	28
2.1.2.3	Ubiquitylation	28
2.1.2.4	Oxydation/nitration	29
2.1.2.5	Acétylation.....	29
2.2	Fonctions physiologiques Vs pathologiques.....	30
2.2.1	Expression et Localisation	30
2.2.2	Fonctions physiologiques et pathologiques	31
2.2.2.1	Fonctions Synaptiques.....	31
2.2.2.2	Métabolisme de la dopamine	32
2.2.2.3	Propagation	33
3	LRRK2.....	36
3.1	Sa localisation	36
3.2	Les différents domaines et leurs fonctions	38
3.2.1	Dans les grandes lignes	38
3.2.2	Les domaines d'interaction protéine/protéine	38
3.2.2.1	Le domaine Armadillo.....	38
3.2.2.2	Le domaine Ankyrine	39
3.2.2.3	Le domaine Leucine-rich repeat	39
3.2.2.4	Le domaine WD40	40
3.2.2.5	Mutation du domaine WD40.....	41
3.2.3	Le domaine ROC/COR (aa 1335 à 1878).....	41
3.2.3.1	La fonction GTPasique	41
3.2.3.2	La dimérisation	42
3.2.3.3	Les mutations du domaine ROC/COR	42
3.2.4	Le domaine kinase de LRRK2 (aa 1879 à 2138)	44
3.2.4.1	Structure.....	44
3.2.4.2	Les mutations du domaine kinase	45
3.3	La régulation de la protéine	46
3.3.1	Ses sites de phosphorylation.....	46
3.3.2	Ses sites d'autophosphorylation	48
3.4	Fonctions physiologiques et pathologiques de LRRK2	50
3.4.1	Cytosquelette	50
3.4.2	Autophagie/endocytose.....	51
3.4.3	Inflammation	52
3.4.4	Mitochondrie.....	53
4	Modélisation expérimentale de la MP chez le rongeur et le Primate non-humain	55
4.1	Les toxines	55
4.1.1	6-OHDA.....	55
4.1.2	MPTP	55
4.2	Pesticides.....	56
4.2.1	Roténone.....	56
4.2.2	Paraquat.....	57
4.3	Injection de fibrilles de synucléine	59
4.4	Les modèles transgéniques.....	60

4.4.1	Modèles transgéniques de Synucléopathie A53T	60
4.4.2	Les modèles Génétiques LRRK2	62
4.5	Les modèles via l'utilisation de vecteurs viraux	64
4.5.1	Généralités sur les vecteurs viraux.....	64
4.5.1.1	Virus adéno-associés (AAV)	65
4.5.1.2	Lentivirus	65
4.5.1.3	HSV.....	65
4.5.1.4	Adenovirus (AdV).....	66
4.5.2	Modèles viraux exprimant la Synucléine.....	66
4.5.3	Modèles viraux exprimant LRRK2.....	68
5	Contexte général et questions posées	69
5.1	Contexte Article 1.....	69
5.2	Contexte Article 2.....	71
6	Objectifs Article 1 et Article 2.....	73
7	Résultats	74
7.1	Article 1	74
7.1.1	Choix de l'approche expérimentale et des outils de vectorisation	74
7.1.2	Article 1	76
7.2	Article 2	77
7.2.1	Choix de l'approche expérimentale	77
7.2.1.1	Caractérisation du modèle α -synucléine	77
7.2.1.2	Optimisation du fragment Δ LRRK2	80
7.2.2	Article 2	82
8	Discussion générale	83
8.1	Pertinence de l'utilisation du fragment Δ LRRK2.....	83
8.1.1	Activité biochimique de Δ LRRK2	83
8.1.2	Activité biologique	83
8.2	La toxicité neuronale du fragment Δ LRRK2.....	84
8.2.1	La différence entre les vecteurs	84
8.2.2	Interaction Δ LRRK2 et α -synucléine	86
8.2.3	Rôle de l'activité kinase.....	88
8.2.4	Phénotype comportemental	90
8.1	Hypothèses sur les voies mis en causes	91
8.1.1	La neuroinflammation	91
8.1.2	Les interacteurs communs entre LRRK2 et l' α -synucléine	92
8.1.3	La mitochondrie	94
8.1.4	L'autophagie.....	95
9	Perspectives	96
9.1	Versatilité des vecteurs utilisés.....	96
9.2	Orientations scientifiques.....	97
9.2.1	Altérations synaptiques.....	97

9.2.2	Développement d'aptamère ciblant LRRK2	98
9.2.3	Imagerie RMN et TEP corrélée à l'histologie.....	98
Annexes.....		100
10 Annexes		100
10.1 Article 1		100
10.1.1	Analyse transcriptomique	100
10.2 Article 2		103
10.2.1	Comportement	103
10.2.1.1	Test du cylindre.....	103
10.2.1.2	Rotation à l'amphétamine	103
10.2.1.3	Résultats	103
10.2.2	Expérience de co-expression Δ LRRK2/Huntingtine82Q	106
10.3 Générale		111
10.3.1	Les inhibiteurs de LRRK2.....	111
10.3.2	Production scientifique	112
10.3.2.1	Publications.....	112
10.3.2.2	Communications orales	112
10.3.2.3	Posters	112
Références.....		113

Liste des figures et tables

INTRODUCTION

Figure 1: Chronologie des faits marquants depuis la première description de la MP en 1817.	2
Figure 2: Voies directe, indirecte et hyperdirecte des ganglions de la base.	5
Figure 3: Synthèse et métabolisme de la dopamine.	6
Figure 4: Altération de la voie des ganglions de la base dans la MP.	7
Figure 5 : Structures des corps de Lewy.	9
Figure 6: Distribution des corps de Lewy dans la MP.	9
Figure 7: Organigramme de l'adaptation du traitement en fonction des observations du clinicien.	16
Figure 8: Métabolisme de la dopamine.	23
Figure 9: Physiopathologie des mécanismes mis en jeu dans la MP.	25
Figure 10: Structure de l' α -synucléine.	26
Figure 11: Fonctions physiologiques au niveau synaptique de l' α -synucléine.	32
Figure 12: Fonctions physiologiques de l' α -synucléine sur le métabolisme de la dopamine.	33
Figure 13: Hypothèse prion de propagation pour l' α -synucléine.	35
Figure 14: Expression de LRRK2 dans le cerveau chez la souris.	37
Figure 15: Relevé de l'expression protéique de LRRK2 en fonction des organes étudiés.	37
Figure 16: Les différents domaines de la protéine LRRK2.	38
Figure 17: Impact des différentes mutations sur l'activité kinase de LRRK2.	43
Figure 18: Structure de la protéine LRRK2.	50
Figure 19: Fonction physiologique de LRRK2 et ses potentiels interacteurs.	54
Figure 20: Mécanisme d'action des toxines et des pesticides.	58
Figure 21: Interactome montrant que LRRK2 interagit indirectement avec l' α -synucléine (SNCA) par l'intermédiaire de partenaires protéiques communs.	72

RESULTATS

Figure 22: Caractérisation de l'injection d' α -synucléine WT ou A53T dans la SNC.	78
Figure 23: Etude comportementale longitudinale des animaux injectés avec la forme A53T de l' α -synucléine.	79
Figure 24: Mesure de la perte neuronale après injection d' α -synucléine A53T.	79
Figure 25: Séquence en acides aminés des constructions Δ LRRK2.	81

ANNEXES

Figure 26 : schéma expérimentale de l'expérience de transcriptomique.	100
Figure 27: Analyse transcriptomique.	102
Figure 28: Tests comportementaux des animaux injectés avec Δ LRRK2 seul à 15 semaines PI.	104
Figure 29: Tests comportementaux des animaux co-injectés avec Δ LRRK2 et l' α -synucléine à 15 semaines PI.	105
Figure 30: Tests comportementaux des animaux co-injectés avec Δ LRRK2 et l' α -synucléine à 6 semaines PI.	106
Figure 31: Mesure du volume de la lésion induite par la sur-expression de mHtt, marquage NeuN et HA.	108
Figure 32: Mesure du volume de la lésion induite par la sur-expression de mHtt, marquage Cox et DARP32.	109
Figure 33: Mesure de l'agrégation de la Htt mutée, marquage ubiquitine et Em48.	110

TABLES

<i>Table 1: Gènes et loci impliqués dans la MP.</i>	12
<i>Table 2: Table des mutations de LRRK2</i>	46
<i>Table 3: Liste des protéines suspectées de phosphoryler ou dé-phosphoryler LRRK2</i>	48
<i>Table 4: Récapitulatif des modèles transgéniques de Synucléopathie (A53T)</i>	62
<i>Table 5: Récapitulatif des modèles transgéniques LRRK2 G2019S</i>	64
<i>Table 6: Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gène dans le SNC</i>	66
<i>Table 7: Récapitulatif des modèles générés via l'utilisation de vecteurs viraux codant pour l'α-synucléine mutée A53T chez le rat</i>	67
<i>Table 8: Récapitulatif des modèles générés via l'utilisation de vecteurs viraux codant pour LRRK2 mutée G2019S chez le rat et la souris.</i>	68
<i>Table 9: Liste des inhibiteurs de LRRK2</i>	111

Liste des abréviations

ΔLRRK2 Partie C-terminale de LRRK2
AAV Virus adéno-associé
HVA Acide homovanilique
ANK Ankyrin
ARM Armadillo
ATP Adenosine triphosphate
BSA Bovine serum albumin
COMT Catéchol-O-méthyl transférases
COR C-terminal of ROC
CL Corps de Lewy
DA Dopamine
DATs Transporteurs de la DA
DCL Démences à corps de Lewy
DDC ou AADC DOPA décarboxylase
GABA Acide γ-aminobutyrique
GB Ganglions de la base
GBA glucocerebrosidase
GFP Green fluorescent protein
GPI/e Globus pallidus interne et externe
GS G2019S mutation
GWAS Genome-wide association studies
HA Hemagglutinin tag
K Kinase domain of LRRK2
KI Knock-in
LCR Liquide-céphalo-rachidien
L-DOPA 3,4-dihydroxyphénylalanine
LRR Leucin-rich repeats
LRRK2 Leucin-rich repeats kinase 2
LV Lentivirus
MBP Myelin basic protein
MAO-A/B Monoamine oxydase A ou B
MP Maladie de Parkinson
NL Neurites de Lewy
PBS Phosphate buffer saline
PD Parkinson's disease
PI Post-injection
PINK1 PTEN-induced putative kinase 1
RCK Kinase domain plus the ROC-COR domain
RCPG récepteurs couplés aux protéines G
ROC Ras-of-complex protein
SNCA Gène codant pour l'α-synucléine
SN substance noire
SNc substance noire *pars compacta*
SNr substance noire *pars reticulata*
SNPs Single-nucleotide polymorphisms
STN Noyau subthalamique
TH Tyrosine hydroxylase
UCLH1 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1
UPS ubiquitin-proteasome system
WT Wild-type

Introduction

1 LA MALADIE DE PARKINSON

1.1 GENERALITES

1.1.1 HISTORIQUE

Sir James Parkinson, médecin britannique, décrit pour la première fois, en 1817, la « paralysie agitante » dont les caractéristiques sont extrêmement proches de la maladie de Parkinson (MP). Il décrit, dans une publication portant sur six cas, des tremblements au repos, des anomalies de la posture et de la marche, une paralysie ainsi qu'une diminution de la force musculaire. En plus d'y décrire les symptômes clés, il en décrit l'évolution dans le temps. Cinquante cinq ans plus tard, Jean Martin Charcot, neurologue français, propose le nom de « maladie de Parkinson » pour cette pathologie en l'honneur des travaux de James Parkinson. En 1912, Frederic Lewy, médecin allemand, décrit des inclusions éosinophiles de substance protéique. Cette observation est validée dans des cerveaux de patients atteints de la MP en 1919 par Konstantin Tretiakoff, un neuropathologiste russe, qui nomme ses inclusions « corps de Lewy » (CL). Dans sa thèse de doctorat de médecine, Konstantin Tretiakoff décrit pour la première fois une dégénérescence de la substance noire associée à la MP. Cette découverte fut validée en 1938 par Rolf Hassler, un neuropathologiste allemand. En 1950, Arvid Carlsson identifie la dopamine (DA) comme étant le neurotransmetteur qui fait défaut dans la MP. Il reçoit en 2000, le Prix Nobel de physiologie ou médecine pour sa caractérisation du rôle de la DA dans la MP (corécepteur avec Eric Kandel et Paul Greengard). C'est seulement en 1997 que l' α -synucleine fût décrite comme étant le composant majeur des corps de Lewy (Spillantini et al., 1997). La **Figure 1**, résume la chronologie des faits marquants.

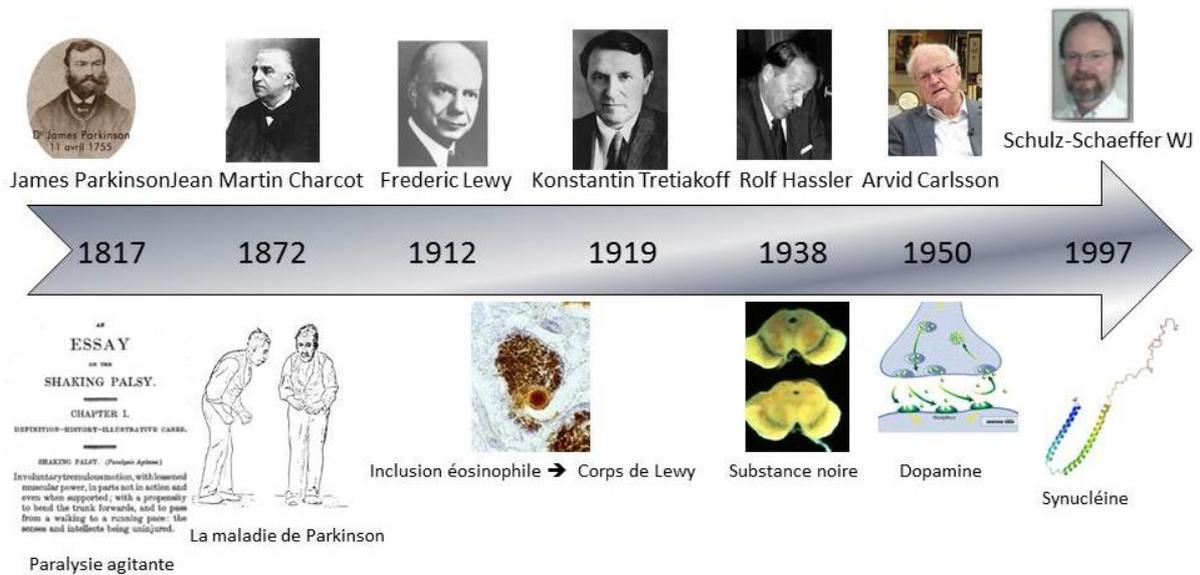


Figure 1: Chronologie des faits marquants depuis la première description de la MP en 1817.

La maladie de Parkinson a été pour la première fois décrite en 1817 par Sir James Parkinson. Cent ans plus tard, la signature histopathologique de la MP était pour la première fois observée dans la substance noire de cerveaux de patients atteints de la MP. Quatre-vingts années après cette découverte majeure, l' α -synucléine est montrée comme étant le composant principal des corps de Lewy.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIE DE LA MP EN QUELQUES CHIFFRES

La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer chez les personnes âgées de plus de 65 ans. A ce jour, la MP touche 150 000 personnes en France et 6,3 millions dans le monde. Si cette pathologie est rare avant 45 ans, sa prévalence augmente avec l'âge, affectant 1 % de la population au-delà de 65 ans (source France Parkinson). Avec l'accroissement de l'espérance de vie, la population risque davantage d'être touchée par les maladies neurodégénératives telles que la MP.

1.1.3 ASPECTS CLINIQUES ET DIAGNOSTIC

Dans la mesure où il n'existe pas d'examen biologiques permettant de poser un diagnostic sûr de la MP, l'examen neurologique permettant de détecter les signes cliniques reste la principale méthode de diagnostic. Dans les premiers temps, la pathologie évolue de façon insidieuse rendant souvent le diagnostic difficile. A mesure que la pathologie progresse, la

MP devient de plus en plus invalidante, rendant les actes de la vie quotidienne difficiles voire impossibles.

Les signes cliniques majeurs sont des symptômes moteurs tels que l'existence d'un tremblement de repos, d'une bradykinésie (lenteur du mouvement), voire une akinésie (absence de mouvement) ainsi qu'une rigidité posturale due à une raideur musculaire (hypertonie). La présence d'au moins deux de ces symptômes oriente vers le diagnostic de la MP. Il est important de noter que le tremblement de repos n'est pas rencontré chez tous les parkinsoniens. S'ajoutent à ces signes majeurs des signes cliniques secondaires tels que la fatigabilité aux mouvements, une maladresse, un visage figé, des troubles de la parole avec une voix monotone et monocorde, une altération de l'odorat, des troubles du sommeil, ainsi qu'une tendance à la dépression chez la moitié des malades. Ces signes secondaires sont souvent des signes avant-coureurs de la pathologie et apparaissent bien avant les symptômes moteurs.

La pathologie se classe en cinq stades, selon l'échelle établie en 1967 par Hoehn et Yahr (Hoehn and Yahr, 1967):

- ❖ Stade I : la maladie n'a pas de véritable retentissement sur la vie quotidienne.
- ❖ Stade II : les signes cliniques sont unilatéraux mais deviennent gênants.
- ❖ Stade III : les signes atteignent les deux côtés du corps et entraînent une modification de la posture. L'autonomie du patient reste possible.
- ❖ Stade IV : le handicap augmente et même si la marche reste possible, l'autonomie est réduite.
- ❖ Stade V : la marche devient impossible et le patient est totalement dépendant.

1.2 ANATOMIE PATHOLOGIQUE

1.2.1 LE SYSTEME DOPAMINERGIQUE

1.2.1.1 LES GANGLIONS DE LA BASE

Les ganglions de la base (GB) ou noyaux gris centraux sont un ensemble de structures sous-corticales intervenant dans le contrôle du mouvement mais aussi possédant un rôle dans diverses fonctions telles que la motivation, et l'apprentissage (Calabresi et al., 1996; Graybiel

et al., 1994; Jahanshahi et al., 2015). Les GB regroupent quatre noyaux : le striatum (noyau caudé et putamen), le globus pallidus interne et externe (GP), le noyau subthalamique (STN) et la substance noire *pars reticulata* (Albin et al., 1989). La Substance noire (SN) est subdivisée en deux parties : la SN *pars compacta* (SNc), qui est formée par les neurones dopaminergiques, et la SN *pars reticulata* (SNpr), qui est formée par les neurones utilisant l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur. Cette boucle cortico-sous-cortico-thalamo-corticale est constituée de voies afférentes et efférentes, excitatrices ou inhibitrices et est représentée dans la figure 2. Trois circuits interviennent dans le contrôle de l'activité des GB (DeLong and Wichmann, 2007; Mink and Thach, 1993) :

1-La voie dite directe est représentée par les projections directes, inhibitrices du striatum sur la substance noire *pars reticulata* et le globus pallidus interne (GPi). Par cette voie, le striatum inhibe l'activité spontanée, tonique et inhibitrice des structures de sortie des noyaux gris centraux (GPi et SNr). Les cellules thalamiques sont alors libérées de l'inhibition et vont à leur tour exciter les aires motrices supplémentaires et les aires prémotrices qui projettent vers le cortex moteur, le tronc cérébral et la moelle épinière. L'activation de la voie directe faciliterait le mouvement.

2-La voie dite indirecte est le circuit qui part du striatum et qui va jusqu'au globus pallidus externe qui se projette ensuite vers le noyau sous-thalamique. Ce dernier se projette, par la suite, sur les voies de sorties (GPi et SNr). Dans la voie indirecte, les excitations corticostriatales entraînent une inhibition du GP externe (GPe) qui entraîne une désinhibition du STN. Ceci a pour conséquence d'exciter les noyaux de sortie. Il en résulte une inhibition du thalamus qui provoque l'excitation accrue de l'aire motrice supplémentaire (Purves et al., 2001).

3-La voie dite hyperdirecte relie le cortex moteur au noyau sous-thalamique. Cette voie est appelée hyperdirecte parce qu'elle est rapide et excitatrice, contrairement aux voies transtriatales directe et indirecte plus lentes (DeLong and Wichmann, 2010).

D'autres modèles proposent l'existence de cinq boucles cortico-sous-cortico-corticales fonctionnant en parallèle : une boucle motrice et une boucle oculomotrice impliquées dans l'initiation et le contrôle du mouvement, deux boucles associatives qui ont un rôle dans les

processus cognitifs et un boucle limbique impliquée dans le contrôle émotionnel (Alexander et al., 1990).

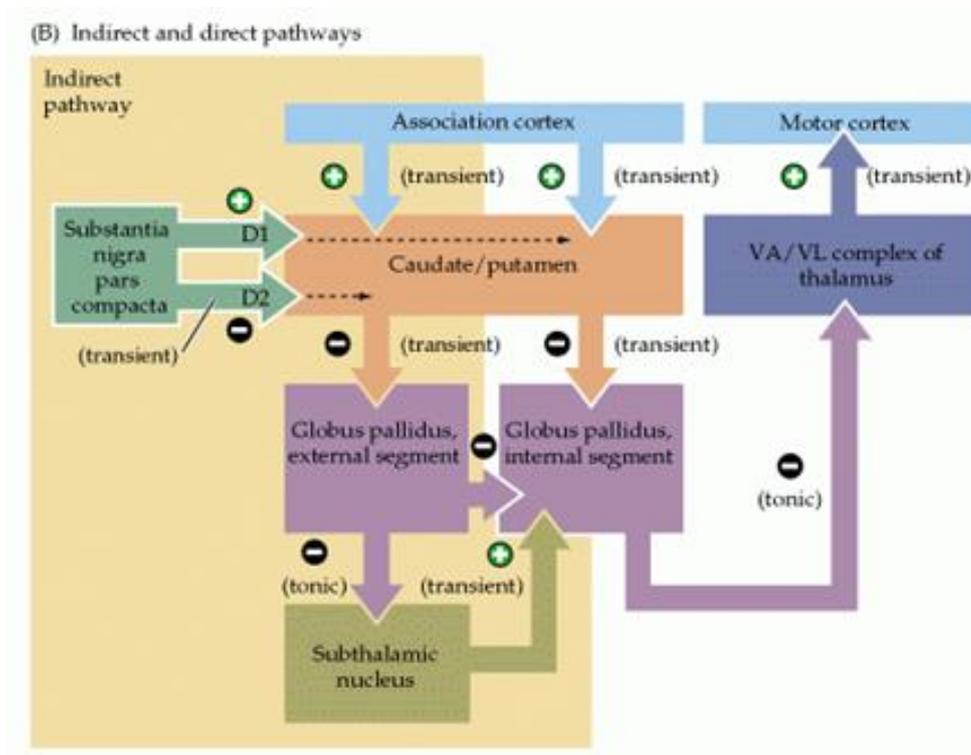


Figure 2: Voies directe, indirecte et hyperdirecte des ganglions de la base.

(A) Dans la voie directe, les projections inhibitrices du caudate et du putamen projettent vers les neurones inhibiteurs du globus pallidus interne (GPI). Le GPI inhibe de façon tonique les noyaux du thalamus. (B) La voie indirecte (encadré jaune) permet l'activation transitoire des neurones inhibiteurs du GPe et inhibe les noyaux subthalamiques. Ces derniers excitent les neurones du GPI et permettent donc de contre-balancer l'action désinhibitoire de la voie directe. (Purves et al., 2001)

1.2.1.2 SYNTHÈSE ET MÉTABOLISME DE LA DOPAMINE

La DA est synthétisée à partir de son précurseur, la tyrosine. Dans le neurone, la tyrosine est convertie en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) via l'action de la tyrosine hydroxylase (TH) et son co-facteur la tétrahydrobioptérine. Cette étape est l'étape limitante dans la synthèse de DA. La L-DOPA est ensuite convertie en DA via la DOPA décarboxylase (DDC ou AADC aromatic acid decarboxylase). La DA est libérée dans la fente synaptique par exocytose calcium-dépendante et peut interagir avec ses récepteurs (Figure 3). Il existe deux familles

de récepteurs différents, D1 et D2, qui sont couplés aux protéines G (RCPG). Les neurones DA ont pour caractéristique de libérer de la DA non seulement au niveau de leurs terminaisons axonales mais également tout le long de l'axone qui comporte de nombreuses varicosités (Schultz, 1998).

Les récepteurs de type D1 (D1 et D5) sont couplés à la protéine $G\alpha_s$ ainsi que $G\alpha_{olf}$. La cascade de réaction qui suit a donc un effet excitateur sur le neurone. A l'inverse, les récepteurs de type D2 (D2, D3, D4) sont couplés aux protéines $G\alpha_i$. La cascade de réaction qui suit a donc un effet inhibiteur sur le neurone (Gerfen and Surmeier, 2011). Ces récepteurs sont abondants dans le striatum. Les D1 sont principalement exprimés par les neurones striato-nigraux et les D2 par les neurones striato-pallidaux ainsi que par les interneurons cholinergiques striataux (Yan et al., 1997).

La DA est catabolisée dans la fente synaptique par la monoamine oxydase A neuronale (MAO-A), par les MAO-A et B gliales (MAO-A + MAO-B) et les catéchol-O-méthyl transférases (COMT) en acide homovanilique (HVA). La DA est recaptée au niveau des synapses par les transporteurs de la DA (DATs). Ces récepteurs ont une haute affinité pour la DA. Environ 90% de la DA libérée dans la fente synaptique va être recaptée par les DATs soit pour être métabolisée par les MAO, soit pour être recyclée et stockée dans des vésicules pour être réutilisée. Les DATs participent au nettoyage la fente synaptique de l'excédent de DA pour mettre fin à la transmission synaptique.

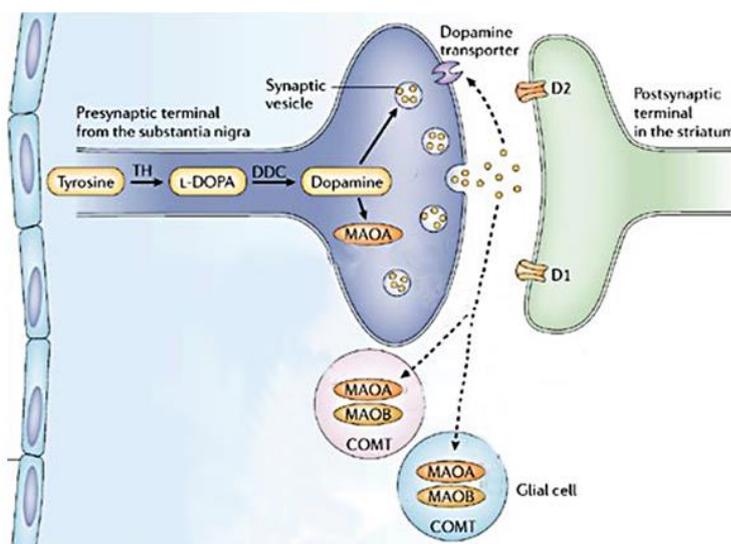


Figure 3: Synthèse et métabolisme de la dopamine

La DA est synthétisée à partir de la tyrosine par la tyrosine-hydroxylase (TH) puis par la DOPA décarboxylase (DDC). (Youdim and Bakhle, 2006).

1.2.1.3 L'ATTEINTE DU SYSTEME DOPAMINERGIQUE DANS LA MP

Dans la MP, les symptômes moteurs sont provoqués par une altération de la voie des GB. L'atteinte progressive spécifique des neurones dopaminergiques de la SNc induit une diminution de la libération de DA au niveau du striatum, diminuant ainsi la capacité des neurones striataux à inhiber le GPe. L'activité tonique du GPe lui permet, lorsqu'il n'est pas inhibé, d'envoyer des décharges au STN de façon tonique. Dans la MP, le STN est hyperactif, ne recevant plus une inhibition suffisante, et stimule de façon anarchique le GPi, qui va inhiber à son tour le thalamus entraînant une diminution de l'excitation sur les neurones du cortex moteur entraînant un phénotype moteur hypokinétique (Purves et al., 2001) (Figure 4).

Lorsque les premiers symptômes apparaissent, la maladie est installée depuis déjà quelques années, en moyenne 5 à 10 ans, et le taux de dopamine est déjà diminué de 50 % dans le striatum.

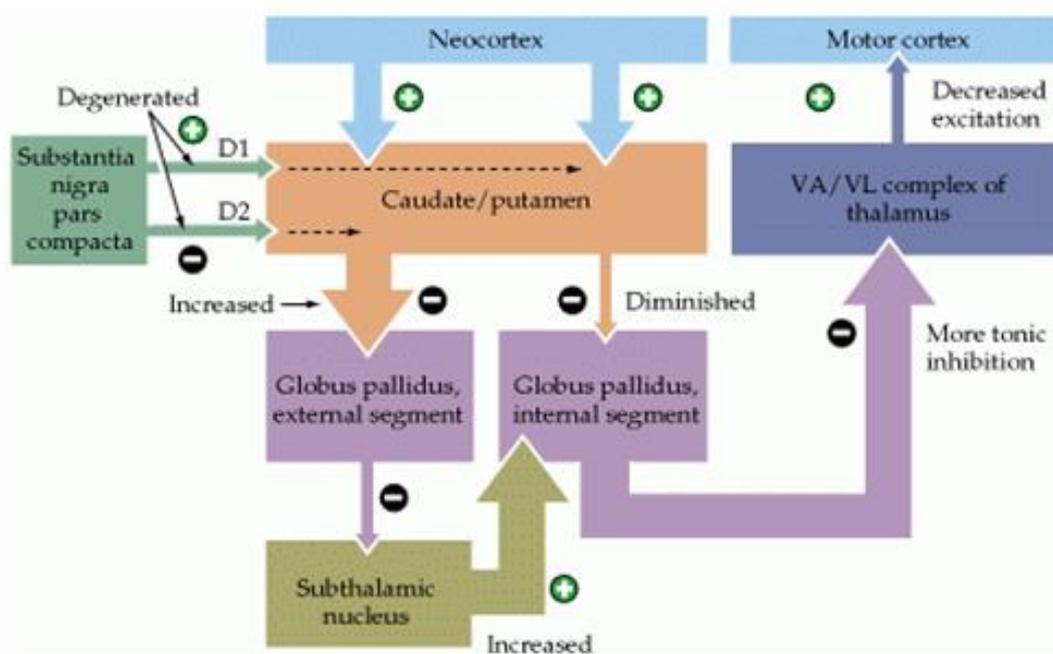


Figure 4: Altération de la voie des ganglions de la base dans la MP.

La dégénérescence des fibres dopaminergiques se traduit par une diminution du taux de dopamine au niveau du caudate/putamen, qui perd sa capacité à inhiber le globus pallidus externe (GPe) induisant une hyperactivité du noyau subthalamique sur le thalamus.

L'inhibition du thalamus entraîne une hypoactivation du cortex moteur (Purves et al., 2001).

1.2.2 CORPS DE LEWY

Comme évoqué dans la partie historique, la MP est caractérisée sur le plan neuropathologique par la présence d'inclusions dans le cytoplasme de corps de Lewy. En microscopie électronique, le CL se compose d'un cœur dense d'où partent des filaments de 9 à 12 nm de largeur formant un halo de fibrilles (**Figure 5**). Morphologiquement, les CL peuvent être divisés en deux catégories, les CL corticaux et les CL des noyaux inférieurs du tronc cérébral. Les CL corticaux se composent uniquement du cœur dense et sont positifs pour l' α -synucléine. Les CL des noyaux inférieurs du tronc cérébral possèdent, quant à eux, le halo de fibrilles (Campbell et al., 2001; Gómez-Tortosa et al., 2000). Ces deux types de CL se distinguent aussi par leur composition en α -synucléine. 64 % des CL dans la SNc sont positifs à l' α -synucléine contre 31 % des CL corticaux (Sakamoto et al., 2002). Les CL ne sont pas uniquement présents dans la MP mais ils sont une signature d'un ensemble de pathologies appelées démences à corps de Lewy (DCL). L' α -synucléine en est un constituant majeur. Comme beaucoup d'agrégats protéiques, les CL ne sont pas constitués que d' α -synucléine, d'autres protéines y sont retrouvées comme les protéines ubiquitines, parkin, UCH-L1 et PINK1 (Wakabayashi et al., 2007). De manière intéressante, ces protéines sont responsables des formes familiales de la MP. D'autres protéines, comme les protéines jouant un rôle dans le système UPS (ubiquitin-proteasome system), ont été identifiées comme étant des composants des CL, incluant les protéines Dorphine, Nub1, P62 (Ito et al., 2003; Kuusisto et al., 2001; Tanji et al., 2011; Zatloukal et al., 2002). Des protéines associées aux microtubules (microtubule-associated protein 1B, 5, 2, Tau) (D'Andrea et al., 2001; Duda et al., 2002; Gai et al., 1995; Jensen et al., 2000) ainsi que des protéines kinases (G-protein-coupled receptor kinase 5) (Arawaka et al., 2006) sont aussi connues pour être co-agrégées avec l' α -synucléine. Les mécanismes impliqués ainsi que la signification de ces co-agrégations sont inconnus.

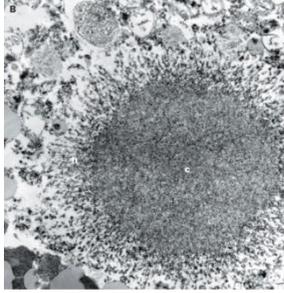


Figure 5 : Structures des corps de Lewy.

En microscopie électronique, le CL se compose d'un cœur dense d'où part des filaments de 9 à 12 nm de largeur formant un halo de fibrilles. (Olanow et al., 2004)

En 2002, Braak et collaborateurs ont publié les différents stades de distribution des CL dans la MP (**Figure 6**). Les CL apparaissent en premier dans les noyaux inférieurs du tronc cérébral ainsi que dans le bulbe olfactif (stade 1 et 2). A ce stade, les patients sont presque asymptomatiques à l'exception de troubles olfactifs. Les CL atteignent ensuite la substance noire, l'amygdale, le noyau subthalamique, et le proencéphale basal (stade 3 et 4). A ce stade, les patients présentent des troubles du sommeil accompagnés de symptômes moteurs. Finalement, les CL se propagent jusqu'au néocortex (stade 5 et 6). Ce stade se caractérise par des déficits cognitifs et émotionnels (Braak et al., 2002).

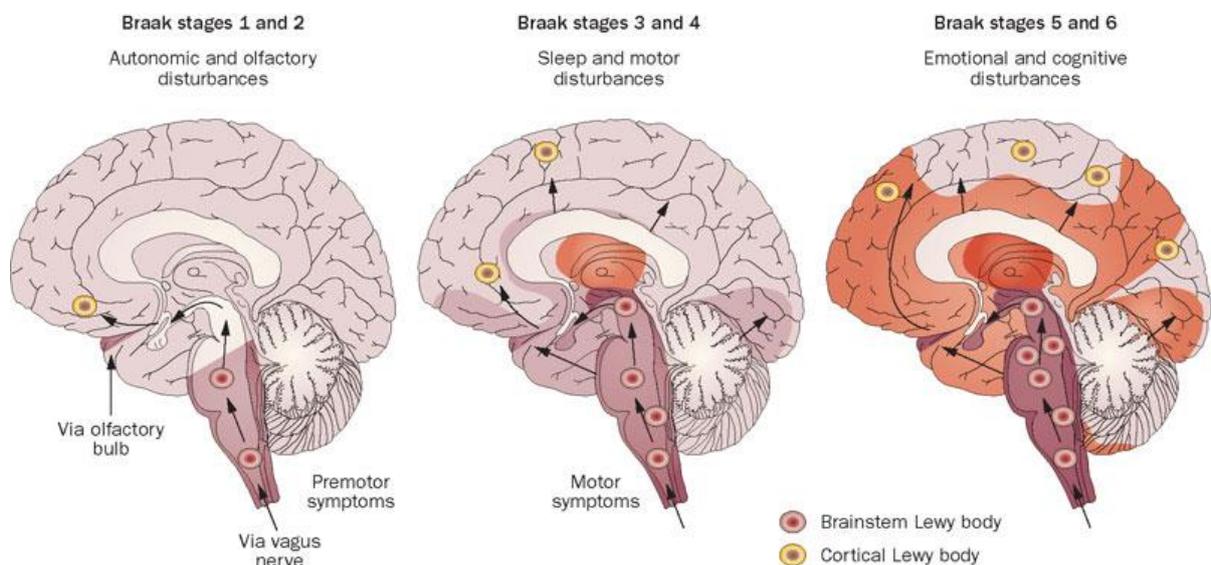


Figure 6: Distribution des corps de Lewy dans la MP.

Les CL apparaissent en premier dans les noyaux inférieurs du tronc cérébral ainsi que dans le bulbe olfactif (stade 1 et 2). A ce stade, les patients sont presque asymptomatiques à l'exception de troubles olfactifs. C'est à partir du stade 3 et 4 que les atteintes motrices apparaissent lorsque les CL ont atteint le cortex et la SN (Doty, 2012).

1.3 ETIOLOGIE

La majorité des cas de MP sont d'origine isolée dont la ou/les causes ne sont pas bien définies. Cependant, trois facteurs semblent jouer un rôle majeur : l'environnement, les prédispositions génétiques ainsi que l'âge. La MP pourrait aussi résulter d'une interaction complexe entre ces différents facteurs. Si 90 % des cas de MP sont d'origine « sporadique », 10% des cas de MP sont attribués à des formes strictement familiales. Ainsi, l'identification des gènes impliqués dans ces formes contribue grandement à la compréhension des mécanismes pathologiques.

1.3.1 SPORADIQUES

Parmi les formes sporadiques de la MP, le facteur environnemental semble être le facteur le plus facilement identifiable. L'exposition aux pesticides ainsi qu'à certains métaux lourds augmente très significativement le risque de déclencher une MP. 5 % des personnes exposées aux pesticides risqueraient de développer la MP contre 3 % pour la population générale (Ascherio et al., 2006). La fréquence d'apparition de la MP est augmentée en milieu rural à cause de l'utilisation de pesticides plus importante qu'en milieu urbain. En France, en 2006, la Sécurité Sociale a reconnu un cas de MP comme maladie professionnelle pour un ancien salarié agricole (source AFP, *Le Monde*). Officiellement, depuis le 7 mai 2012, le lien de causalité entre la MP et l'exposition aux pesticides est reconnu par l'Etat français (source *Le Monde, L'Humanité*). La roténone et le paraquat sont deux pesticides dont la responsabilité dans le déclenchement d'un syndrome parkinsonien a été confirmée dans des modèles animaux (Cf. Chapitre 4, modélisation expérimentale de la MP). De même, l'exposition chronique à différents types de métaux lourds comme l'aluminium, le mercure, le plomb, le cuivre ou encore le manganèse aurait un impact sur l'organisme et plus spécifiquement sur la SNc où les métaux lourds semblent s'accumuler (Zecca et al., 1994).

1.3.2 FORMES GENETIQUES

Il s'agit de formes familiales monogéniques à transmission mendélienne (Corti et al., 2011). On distingue les formes à transmission autosomale dominantes (SNCA, LRRK2) ou récessives (parkin, PINK1, DJ-1,...). La **Table 1** résume les principaux gènes et *loci* impliqués dans la MP. Le premier point qu'il est important de noter est la différence dans l'âge de début de la

pathologie en fonction du gène impliqué. Par exemple, les mutations dans le gène qui code la protéine Parkin sont responsables de formes précoces avec l'apparition des premiers symptômes avant 40 ans. Cet âge de début de la pathologie contraste avec l'apparition relativement tardive des premiers symptômes chez les porteurs de mutations de LRRK2. Un deuxième point important à noter est la diversité dans les fonctions des protéines impliquées. Si les fonctions mitochondriales semblent être nettement impactées avec les protéines PINK1, parkin et DJ-1 qui ont des fonctions et localisations mitochondriales, d'autres fonctions semblent être altérées par les protéines LRRK2 ou SNCA.

Locus	Gène	Protéine	Chromosome	Transmission	Forme
PARK1/PARK4	SNCA	α -synucléine	4q21	AD	P/T
PARK2	PARK2	Parkin	6q25-27	AR	P
PARK3	ND		2p13	AD	T
PARK5	UCHL1	UCHL1	4p14	AD	T
PARK6	PINK	PINK1	1p36	AR	P
PARK7	PARK7	DJ-1	1p36	AR	P
PARK8	LRRK2	LRRK2	12q12	AD	T
PARK9	ATP13A2	ATPase type 13A2	1p36	AR	P, Kufor-Rakeb Syndrome
PARK10	ND		1p32	ND	T
PARK11	GIGYF2	GRB10 interacting GYF protein 2	2q37	AD	T
PARK12	ND		Xq21-25	Lié au chromosome X	T
PARK13	HTRA2		2p12	AD	T
PARK14	PLA2G6		22q13	AR	P
PARK15	FOXB7		22q12-13	AR	P
PARK16	ND		1q32	Facteur de risque	T
PARK17	VPS35		16q11	Facteur de risque	T
PARK18	EIF4G1		3q27	Facteur de risque	T
	GBA		1q21	Facteur de risque	T
	BST1		4p15	Facteur de risque	T
	MAPT		17q21	Facteur de risque	T

ATX2	12q12	Facteur de risque	T
ATXN3	14q32	Facteur de risque	T

Table 1: Gènes et loci impliqués dans la MP. P= Précocité, T= Tardif, AD= Autosomale dominant, AR= Autosomale récessif.

1.3.2.1 LEUCIN-RICH REPEAT KINASE 2 (LRRK2)

Chez l'Homme, la protéine LRRK2 est codée par le gène *LRRK2* porté par le chromosome 12p11.2-q13.1., fut pour la première fois décrit comme étant lié à la maladie de Parkinson par Funayama en 2002. Le terme *PARK8* suit la nomenclature attribuée pour les gènes mis en cause dans la maladie de Parkinson (« PARK » suivi du numéro correspondant à l'ordre de découverte) (Funayama et al., 2002). Dans une étude assez ancienne datée de 1997, Hasegawa et Kowa ont identifié une famille Japonaise vivant à Sagami-hara City et développant depuis 5 générations des cas de Parkinsonisme à transmission autosomale dominante. Dans cette famille, le phénotype parkinsonien ne différait pas d'un phénotype classique (idiopathique) et les patients étaient répondeurs à la levodopa (Cf paragraphe Traitement). Les analyses neuropathologiques ont démontré une dégénérescence pure de la voie nigrale sans la présence de corps de Lewy. Les analyses de liaison génétique n'avaient pas mis en évidence de mutation sur des loci déjà connus comme étant relié à la MP. Environ 5 ans plus tard, Funayama et ses collaborateurs identifiaient ce nouveau locus, *PARK8*, grâce à des analyses génomiques plus fines. En plus d'avoir identifié ce nouveau locus, les auteurs ont fait une observation très intéressante concernant la pénétrance de cette mutation qui est très partielle, suggérant des effets additionnels tels que d'autres facteurs génétiques ou des causes environnementales qui pourraient modifier l'expression de la pathologie. Ce n'est qu'en 2004 que deux études menées en parallèle identifiaient la protéine codée par le locus *PARK8* : LRRK2/Dardarine. Ces deux études, ont été publiées à la même date dans le même journal (Paisán-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). Dans la première étude, Paisan-Ruiz et ses collaborateurs nommèrent cette protéine Dardarine, qui signifie « tremblement » en Basque, car la majorité des cas (5 familles d'Angleterre et d'Espagne) qu'ils ont étudiés avait des origines basques. Les mutations R1441G et Y1699C sont décrites, chez ces familles, avec une pénétrance de 100%, contrastant avec les données obtenues dans la famille Japonaise

qui reportait une pénétrance de l'ordre de 70%. La mutation R1441G est associée à un début tardif de la pathologie autour de 65 ans. Dans la seconde étude, les auteurs identifièrent deux nouvelles mutations sur le gène codant la protéine LRRK2, R1441C, I2020T et un site putatif de mutation, L1114L. La mutation G2019S, décrite en 2005 (Kachergus et al., 2005), est la plus commune des formes génétiques de la MP car elle représente environ 5% des cas et jusqu'à 30% dans certaines ethnies. Il est important de noter que la majorité des patients porteurs de mutations sur le gène codant la protéine LRRK2 présentent une aggrégation anormale de l' α -synucléine en CL (Cookson et al., 2008).

1.3.2.2 SYNUCLEINE

En 1988, Maroteaux et collaborateurs décrivent une protéine associée aux vésicules cholinergiques dans l'organe électrique de la raie du Pacifique (*Torpedo californica*). Ils décrivent également une protéine homologue dans le cerveau de rat (Maroteaux et al., 1988). Le terme synucléine fut adopté à cause de sa localisation dans les terminaisons nerveuses pré-synaptiques ainsi que nucléaire, suggérant un rôle dans la transduction du signal nerveux (Iwai et al., 1995).

Les protéines synucléines ont été décrites indépendamment par différents groupes. Les synucléines appartiennent à une famille de protéines solubles composée de trois isoformes incluant l' α -synucléine (ou NACP), la β -synucléine (ou PNP14) et la γ -synucléine (ou BCSG1) et codées respectivement par les chromosomes 4q21.3-q22, 5q35 et 10q23. L' α -synucléine est de loin la plus étudiée des isoformes de par son implication dans de nombreuses pathologies neurodégénératives. Ces maladies incluent la MP, la DCL (Démence à Corps de Lewy) et les AMS (Atrophie multisystématisée), regroupées sous le terme de Synucléopathie. Ces différentes pathologies sont caractérisées par la présence d'inclusions intracytoplasmiques d' α -synucléine (Spillantini et al., 1997) et diffèrent par les aires cérébrales et les populations cellulaires affectées, menant à des phénotypes cliniques différents (Spillantini et al., 1997). En plus d'être un composant majeur des corps de Lewy, signature histopathologique de la MP, certaines mutations dans le gène codant pour l' α -synucléine sont montrées comme pouvant accélérer son aggrégation. Six mutations responsables de formes familiales de la MP ont été identifiées, A30P, A53T, E46K, H50Q, G51D et A53E (Krüger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997; Zarranz et al., 2004, Appel-

Cresswell et al., 2013; Proukakis et al., 2013, Pasanen et al., 2014). La mutation A53T a été identifiée chez une famille italo-américaine. La mutation A30P a été décrite chez une famille allemande. La mutation E46K a été identifiée chez une famille espagnole. Ces trois mutations ont la capacité d'induire l'agrégation de l' α -synucléine et sont associées à des formes précoces de la MP (Li et al., 2001). Les mutations H50Q, G51D et A53E ont été décrites très récemment. Deux groupes indépendants ont rapporté l'existence de la substitution H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013; Proukakis et al., 2013). Cette mutation est associée à un début tardif de la pathologie. La mutation G51D (Kiely et al., 2013) et la mutation A53E sont responsables d'un début précoce de la pathologie (Ghosh et al., 2014; Pasanen et al., 2014).

Les duplications et les triplications du gène de l' α -synucléine conduisant à sa surexpression sont aussi responsables d'un début précoce de la MP (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003).

1.4 TRAITEMENTS

Les traitements disponibles ne sont pas curatifs mais permettent le plus souvent une nette amélioration des troubles. On distingue deux types de traitements, les traitements médicamenteux et les traitements non médicamenteux.

1.4.1 LES TRAITEMENTS MÉDICAMENTEUX

La stratégie thérapeutique utilisée pour pallier au déficit de dopamine est d'augmenter sa quantité dans le cerveau. Le traitement de première intention est la L-Dopa ou lévodopa. C'est un précurseur de la dopamine naturelle qui va être transformé en dopamine. Ce traitement est couplé à un inhibiteur de la dopa décarboxylase périphérique ou de la catéchol-O-méthyl transférase (COMT, entacapone, tolcapone) qui permet de diminuer sa transformation périphérique en dopamine et de multiplier par 10 sa disponibilité au niveau du système nerveux central. Généralement, cette combinaison entraîne une nette amélioration des symptômes, et ceci dès les premières prises, soit quelques jours à une dose suffisante. La non-réponse du patient à ce traitement remet en cause le diagnostic de la MP. Malheureusement, l'efficacité de la L-Dopa s'épuise généralement après plusieurs années de traitement (en moyenne 10 ans), avec l'apparition d'effets indésirables variables selon les patients (dyskinésies).

Une autre stratégie pour mimer les effets de la dopamine est l'utilisation d'agonistes dopaminergiques (apomorphine, pramipexole, piribédil, ropinirole, rotigotine, bromocriptine). Ces substances agissent directement sur les récepteurs post-synaptiques de la voie nigro-striée. Ils sont utilisés en monothérapie au début du traitement ou en combinaison avec la L-Dopa dans les stades plus avancés de la pathologie, pour réduire l'utilisation de la L-DOPA (Connolly and Lang, 2014; Fox et al., 2011).

L'inhibition de la dégradation de la dopamine par les inhibiteurs de la MAOB (selegiline et rasagiline) est aussi une stratégie thérapeutique utilisée notamment en première intention de traitement chez un patient jeune (avant 60 ans). La **Figure 7** présente l'organigramme de l'adaptation du traitement en fonction des observations du clinicien.

L'effet thérapeutique de la L-dopa et des agonistes dopaminergiques est purement symptomatique sur les troubles moteurs, et de durée limitée. La variabilité de cet effet dans le temps peut entraîner des périodes de relative inefficacité (fin de dose) et des périodes de variation brusque de motricité (effet *on-off*). Plusieurs options se présentent : (1) fractionnement du traitement par L-dopa, (2) utilisation d'un inhibiteur de la catéchol-O-méthyl-transférase (I-COMT) ou de la mono-amine-oxydase-B (MAO-B), (3) utilisation d'un agoniste dopaminergique ou renforcement de la dose de celui déjà utilisé, (4) utilisation des formes L-dopa à libération prolongée. Les 4 solutions sont possibles, le choix final étant dicté par l'expérience du clinicien.

D'autres types de traitements sont utilisés dans les cas de syndromes parkinsoniens induits par les neuroleptiques, comme les anticholinergiques ou les antagonistes des récepteurs au glutamate, comme l'amantadine, qui augmentent la libération de dopamine et bloquent la réabsorption de dopamine.

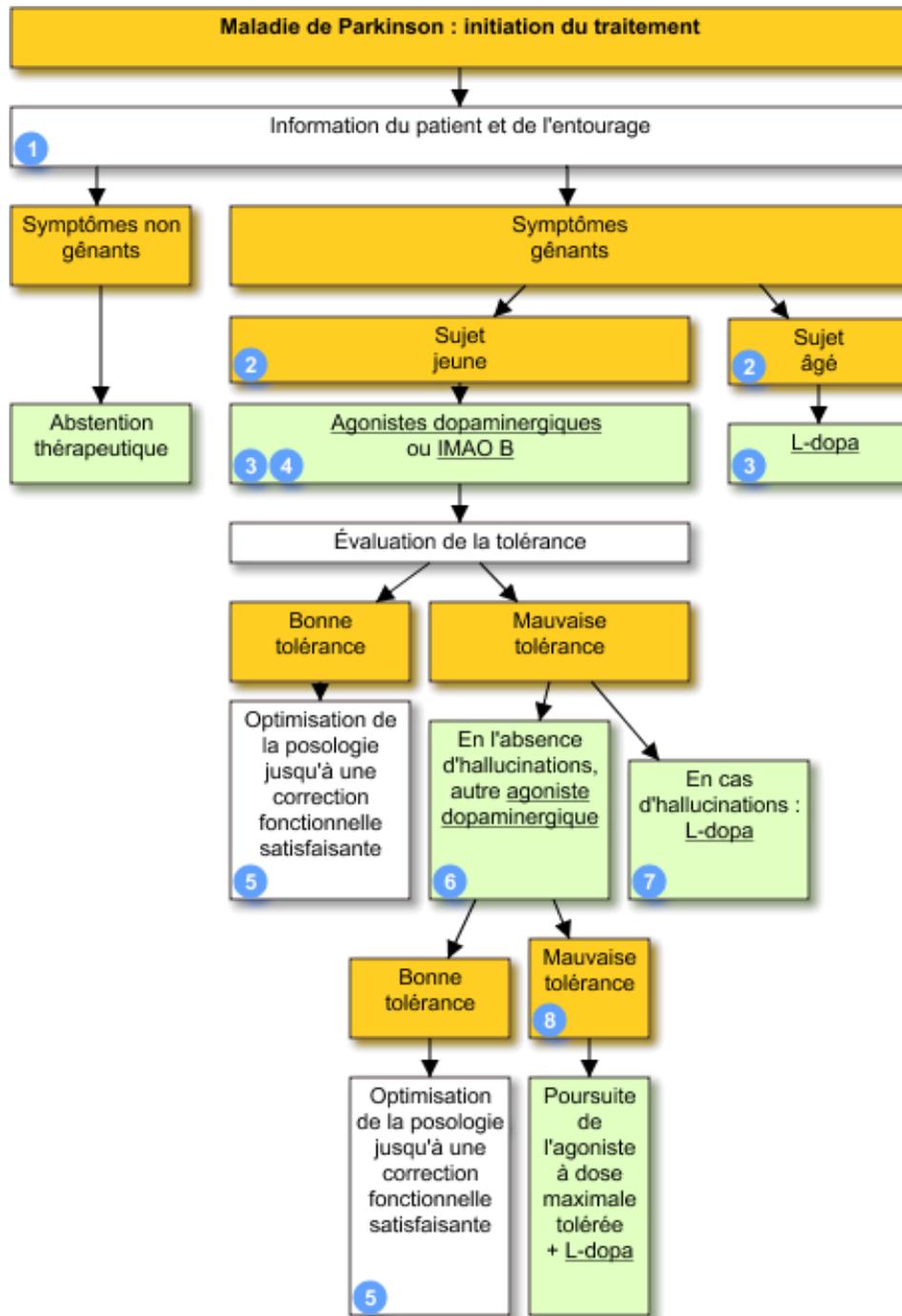


Figure 7: Organigramme de l'adaptation du traitement en fonction des observations du clinicien

<http://apisoap-demo.vidal.fr/data/reco/vidal/com/vidal/data/reco/rc1533.html>

1.4.2 LES TRAITEMENTS NON MEDICAMENTEUX

Parmi les traitements non médicamenteux, on peut distinguer les traitements invasifs, comme la stimulation cérébrale profonde et les traitements non invasifs, comme la stimulation magnétique transcrânienne ou encore l'exercice physique, tel que la danse. La

stimulation cérébrale profonde (SCP) est l'approche la plus répandue et la mieux étudiée depuis son apparition. La SCP requiert une opération chirurgicale et est appliquée dans un cadre précis : le patient doit avoir développé la maladie depuis 5 ans et ne doit présenter ni trouble cognitif sévère, ni trouble psychiatrique. Une bonne sensibilité à la L-dopa est un critère essentiel car elle prédit l'efficacité de la SCP. 10 % de la population des patients est éligible à ce traitement mis au point par deux équipes françaises à Bordeaux et Grenoble (Benazzouz et al., 1993). Pour plus de précision sur la SCP, une revue récemment publiée par Faggiani et Benazzouz résume l'historique de la SCP (Faggiani and Benazzouz, 2016). Depuis, plusieurs dizaines de milliers de patients en ont bénéficié, 80 000 patients d'après le site de medtronic (<http://clinicaltrials.medtronic.com/>).

1.4.3 LES NOUVELLES PISTES DE TRAITEMENTS

1.4.3.1 LA THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique fait partie des traitements dits invasifs. Le futur cahier des charges pour accéder à ce traitement sera semblable à la stimulation cérébrale profonde, c'est-à-dire une bonne réponse à la L-Dopa ainsi que l'apparition de complications motrices invalidantes.

Les stratégies neuroprotectrices potentielles de thérapie génique utilisent principalement les facteurs neurotrophiques impliqués dans la croissance et la protection des neurones (Glial derived neurotrophic factor (GDNF), et la neurturine (NTN) (Hickey and Stacy, 2013). En 2012, un essai clinique a débuté chez l'homme, visant à tester la sécurité et la tolérance de l'injection d'un vecteur viral (adéno-associated virus (AAV)) codant pour le GDNF. Les résultats finaux sont attendus pour 2025 (Su et al., 2009).

Une autre stratégie potentielle est de palier au déficit en dopamine. Comme dit plus haut, la tyrosine est transformée en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH). La L-DOPA est décarboxylée par la dopa décarboxylase (DDC) pour former de la dopamine. Afin de fonctionner, la TH a besoin d'une autre enzyme appelée la GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1) qui permet la synthèse de biopetirine, un co-facteur essentiel pour le fonctionnement efficace de la TH. Un vecteur lentiviral équivalant a été mis au point permettant l'expression de ces trois enzymes nécessaires à la production de dopamine (vecteur appelé ProSavin). Après la mise en évidence de son efficacité dans un modèle de la MP chez le primate non-humain au

laboratoire, un essai clinique a été initié (Jarraya et al., 2009). Ce vecteur a été injecté dans le striatum de 15 patients (12 à l'hôpital Henri-Mondor, Créteil, et 3 patients à l'hôpital d'Addenbrookes, à Cambridge) (Palfi et al., 2014) montrant une bonne tolérabilité et des effets bénéfiques encourageants. Un suivi à long terme de ces patients est prévu jusqu'en 2022.

1.4.3.2 LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES

Les greffes de cellules souches embryonnaires ont débuté dans les années 90, montrant une certaine efficacité (Lindvall et al., 1994). Récemment, il a été montré que ces greffons sont encore présents 25 ans après leurs implantation (Li et al., 2016). Malheureusement, la préparation/dissection des embryons conduit à la formation de régions très sérotoninergique dans le greffon produisant des dyskinesies (Politis et al., 2010). Après de nombreuses études, des evidences ont suggérés qu'il fallait arrêter cette approche, notamment chez les patients le plus âgés, plus sujets aux dyskinesies (Freed et al., 2001).

L'utilisation de cellules souches reprogrammables pourrait permettre de mieux contrôler la nature des cellules implantées, en particulier leur homogénéité. A partir de cellules d'embryons humains ou d'autres tissus, il est possible d'obtenir des cellules souches ou des iPSC (induced pluripotent stem cells) capables d'être reprogrammées artificiellement en neurones dopaminergiques, via une bonne combinaison de facteurs de croissance. Cette étape est la principale limite, car actuellement, ces cellules ne se prêtent pas à une culture intensive, nécessaire à une utilisation chez l'Homme. Ces neurones dopaminergiques seront ensuite implantés dans le striatum des patients. Actuellement, les greffes de neurones dopaminergiques issus d'hESC ou iPSC sont étudiées chez l'animal pour évaluer (1) qu'aucune tumeur ne se forme après implantation des cellules, (2) que le greffon est accepté par l'organisme, et (3) que le greffon s'intègre et est capable de créer des connexions avec les neurones résidents, et (4) ainsi puisse produire un effet fonctionnel bénéfique.

1.4.3.3 L'IMMUNOTHERAPIE SYNUCLEINE

Il a été montré que le niveau d'expression de l' α -synucléine est un facteur de risque majeur pour la MP. La présence d'agrégats macroscopiques (CL, NL) et d'espèces moléculaires plus petites (oligomères, fibrilles) suggèrent que l'agrégation de l' α -synucléine joue un rôle causal

dans les synucléinopathies. L'agrégation de la synucléine est fonction de sa structure primaire, comme l'atteste les mutations pathologiques pro-aggrégantes mais également de sa concentration. Par ailleurs, il a été montré que les espèces moléculaires agrégées, probablement causales dans les synucléinopathies, étaient capables de se propager de cellule en cellule par un mécanisme semblable aux mécanismes impliqués dans les maladies à prion (Emmanouilidou et al., 2010; Jang et al., 2010; Lee et al., 2005, 2010b). L' α -synucléine étant retrouvée en extracellulaire dans le sang, ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) chez les patients atteints de la MP mais aussi chez les sujets sains, l'idée de réduire à l'aide d'anticorps les quantités d' α -synucléine, en particulier ses formes agrégées, pour ralentir l'évolution de la pathologie, a été proposée (El-Agnaf et al., 2003; Mollenhauer et al., 2010). Une stratégie similaire est étudiée depuis de nombreuses années pour la maladie d'Alzheimer, pour diminuer les concentrations de $A\beta$ (amyloïde- β).

Il existe deux types d'immunothérapie anti-synucléine. La première consiste à administrer aux patients des anticorps artificiels dirigés contre les formes toxiques de l' α -synucléine, afin d'en faciliter son élimination. En 2014, suite à des études encourageantes dans les modèles animaux de synucléinopathies (Masliah et al., 2005, 2011), un essai de phase 1 en double aveugle a débuté sur des volontaires sains pour évaluer la tolérabilité et l'innocuité de cette stratégie thérapeutique. L'autre stratégie (immunothérapie active) consiste à apprendre au système immunitaire à reconnaître les formes toxiques de l' α -synucléine pour que le système immunitaire puisse les détecter et les éliminer (Lee and Lee, 2016; Mandler et al., 2014). Des essais cliniques ont débuté afin d'évaluer l'apparition d'effets indésirables liés à l'administration unique ou répétée d'un peptide ressemblant à l' α -synucléine. Le projet PD01A a été lancé en 2012 par la société Affiris montre que les injections sous-cutanées de PD01A sont bien tolérées et induisent des améliorations statistiquement significatives sur les symptômes moteurs et non moteurs.

1.5 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MP

Dans cette partie, les potentiels mécanismes mis en cause dans la MP sont résumés. En effet, bien qu'il soit suggéré que la neuroinflammation, un dysfonctionnement mitochondrial ainsi qu'un dysfonctionnement des voies autophagiques semblent être mis en jeu dans la MP, le scénario précis de leurs implications dans la progression de la pathologie restent

méconnus. La notion que ces différents mécanismes pourraient coopérer mutuellement dans l'initiation de la mort neuronale est aussi à envisager (Michel et al., 2016). Les principales dysfonctions observées dans la MP sont résumées dans le schéma récapitulatif **Figure 9**.

1.5.1 NEUROINFLAMMATION

Le lien entre neuroinflammation et MP a été établi grâce à l'étude *post-mortem* de cerveau de patients atteints de MP. Plusieurs études ont montré la présence de cellules microgliales et d'astrocytes activés dans la substance noire de patients atteints de la MP (Damier et al., 1993; McGeer et al., 1988). En conditions pathologiques, les cellules microgliales passent d'un état quiescent (prolongements ramifiés) à un état activé (amiboïde). Ce changement morphologique induit un changement de leurs réponses moléculaires pour lutter contre l'évènement pathologique. Elles sécrètent alors des médiateurs proinflammatoires, tels que des cytokines (TNF α , interleukine 1 β , interféron γ) ainsi que du monoxyde d'azote (NO) (Hirsch et al., 2012). La substance noire est une région particulièrement sensible au stress oxydant causé par le NO. Les protéines tyrosine-hydroxylase ainsi que l' α -syncléine, du fait de leur composition, sont particulièrement sujettes aux dommages oxydants (Przedborski et al., 2001). Par exemple, la tyrosine-hydroxylase perd son activité enzymatique lorsqu'elle est nitrosylée (Ara et al., 1998). De plus, les neurones DA expriment des récepteurs aux cytokines secrétées par les cellules microgliales (Mogi et al., 2000). Le rôle protecteur ou délétère de la neuroinflammation dans la MP n'est pas encore établi (pour une revue détaillée de ses aspects : Le et al., 2016). De plus, il n'est pas encore bien établi si la neuroinflammation est une cause ou, au contraire, une conséquence du déclenchement de la pathologie.

1.5.2 DYSFONCTION MITOCHONDRIALE

Plusieurs observations suggèrent que les dysfonctions mitochondriales sont au cœur de la physiopathologie de la MP. (1) Dans la substance noire de patients, un défaut du complexe I de la chaîne respiratoire est observé (environ 40% des patients) (Schapira et al., 1989), (2) des altérations dans les niveaux d' α -kétoglutarate deshydrogénase sont observées, (3) des toxines inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire induisent chez l'homme, comme chez les modèles animaux, une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques

induisant un phénotype semblable à la MP (Betarbet et al., 2000; Langston et al., 1983, 1984). (4) L'identification de mutations sur des gènes codant des protéines impliquées dans des fonctions mitochondriales ou ayant une localisation mitochondriale, notamment les protéines PINK1, DJ-1 et Parkin responsables de formes familiales de la MP, ont été décrites (Corti et al., 2011). Parkin et PINK1 joueraient un rôle prépondérant dans l'élimination des mitochondries par la voie de l'autophagie (Narendra et al., 2008), processus appelé « mitophagie ».

1.5.3 DYSFONCTION AUTOPHAGIE/PROTEASOME

Essentielle à l'homéostasie cellulaire, l'autophagie permet l'élimination et le remplacement des protéines et des organelles non fonctionnelles via deux voies principales : la macroautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA). En parallèle, le protéasome est responsable de l'élimination de protéines mal conformées ou dénaturées par protéolyse. Maintenir un niveau d'activité de ces systèmes est essentiel à la survie cellulaire. Ceci devient particulièrement important du fait que le vieillissement altère le bon fonctionnement de l'autophagie (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Le concept de stress protéolytique vient de l'observation que, dans le cerveau de patients atteints de la MP, la présence élevée de vésicules autophagiques est observée, contrastant avec la faible détection dans un cerveau sain, dû à la rapide clairance de ses vésicules dans le système nerveux central (Anglade et al., 1997). A partir de cette observation, plusieurs hypothèses sont proposées et, notamment, une activation aberrante du système ou à l'inverse un défaut dans la clairance de ces vésicules.

La présence d'agrégats de synucléine dans la MP semble confirmer l'état de stress protéolytique, et le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome (UPS) pourrait en être la cause. En effet, l' α -synucléine est dégradée par le système autophagique ainsi que par le protéasome (Webb et al., 2003).

1.5.4 LE METABOLISME DE LA DOPAMINE

La vulnérabilité de la substance noire pourrait s'expliquer en partie par le métabolisme de la DA, connu pour produire une quantité importante d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) pouvant entraîner un stress oxydant ainsi que des produits cytotoxiques dérivés de la DA qui

peuvent être formés durant sa biosynthèse, comme les quinones ou la tétrabioptéridine (Choi et al., 2003; Graham, 1978). La dopamine est capable de s'auto-oxyder pour former la DA quinone ainsi que la cysteinyl-DA. Ce mécanisme peut-être spontané ou catalysé par des métaux, notamment le fer (Halliwell and Gutteridge, 1984), ou encore par la présence de radicaux hydroxyles (Nappi et al., 1995). A pH neutre, la DA quinone est transformée en neuromélanine via plusieurs étapes de transformation. A pH acide, cette transformation n'a pas lieu, et conduit à la formation de composés pouvant se lier aux sites apuriques de l'ADN, générant des mutations qui pourraient conduire à la dégénérescence des neurones (Zahid et al., 2011).

La dégradation de la DA par les MAO conduit à la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, dans un environnement enrichi en fer comme l'est la SNc, induit par la réaction de Fenton la formation de radicaux hydroxyl hautement réactifs (Lotharius and Brundin, 2002) (**Figure 8**).

Dans le neurone, la glutathione peroxydase (GPX), en présence de glutathion (GSH), a pour rôle de détoxifier le cytoplasme en transformant le H_2O_2 en molécule d'eau et en glutathion oxydé (GSSG), molécule assimilable contrairement à l' H_2O_2 . La glutathion réductase, en présence de $NADP^+$, est responsable de la réduction rapide du GSSG pour le recycler en GSH. Dans le cerveau de patients atteints de la MP, une diminution des taux de GSH et de l'activité de la GPX a été observée, ce qui pourrait empêcher la détoxification des neurones (Lotharius and Brundin, 2002).

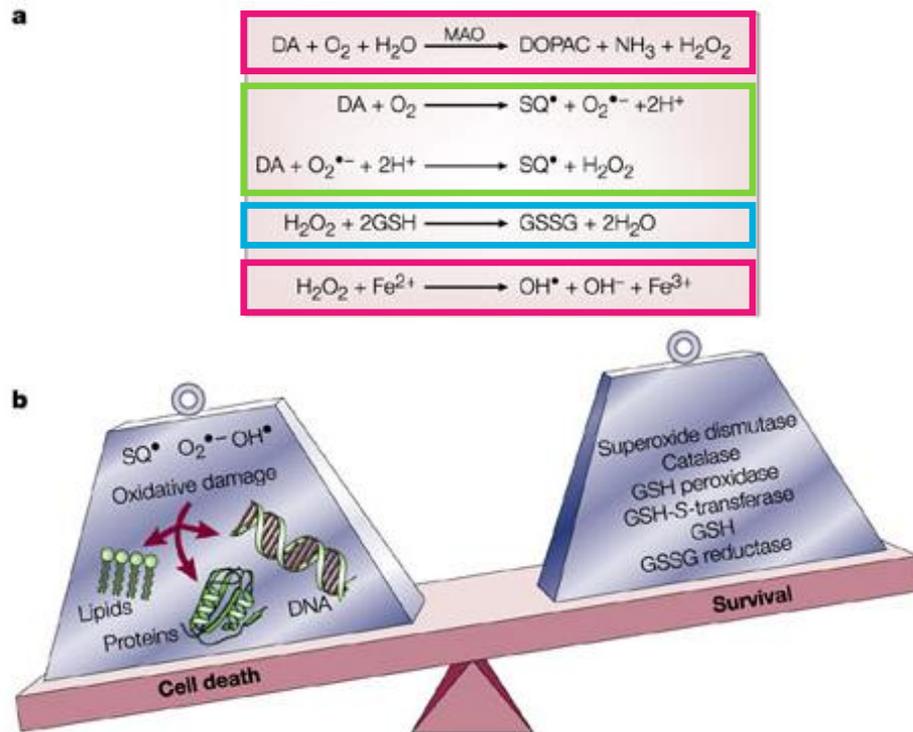


Figure 8: Métabolisme de la dopamine.

La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène lors de la synthèse de DA pourrait être responsable de la mort cellulaire observée dans les neurones DA de la SN dans la MP. SQ^\bullet : dopamine quinone, OH^\bullet : radical hydroxyle, $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, MAO : Monoamine oxydase, Fe : Fer, GSH : glutathione peroxydase, GSSG : glutathione oxydée, NH_3 : ammoniacque. Réaction de Fenton encadrée en rose. Formation de la DA quinone encadrée en vert. Réaction de détoxification par la GSH encadrée en bleu. Modifié de (Lotharius and Brundin, 2002).

La formation de neuromélanine ou 5,6-dihydroxyindole conduit à la pigmentation foncée des neurones DA de la SNc, bien que tous les neurones de la SNc ne soient pas pigmentés. C'est un chélateur des métaux lourds et, en particulier, de fer (Sulzer and Zecca, 1999). La neuromélanine est responsable de l'extraction et du nettoyage des métabolites toxiques dans la substance noire. Il est suggéré que la neuromélanine dans les stades précoces du développement de la pathologie pourrait jouer un rôle protecteur, retardant l'apparition de

la pathologie. Lorsque ce système n'est plus capable de jouer ce rôle protecteur, la neuromélanine serait dégradée, ce qui entraînerait son expulsion dans le milieu extracellulaire. Il est suggéré que cette neuromélanine extracellulaire pourrait déclencher l'activation des cellules microgliales (Zecca et al., 2006).

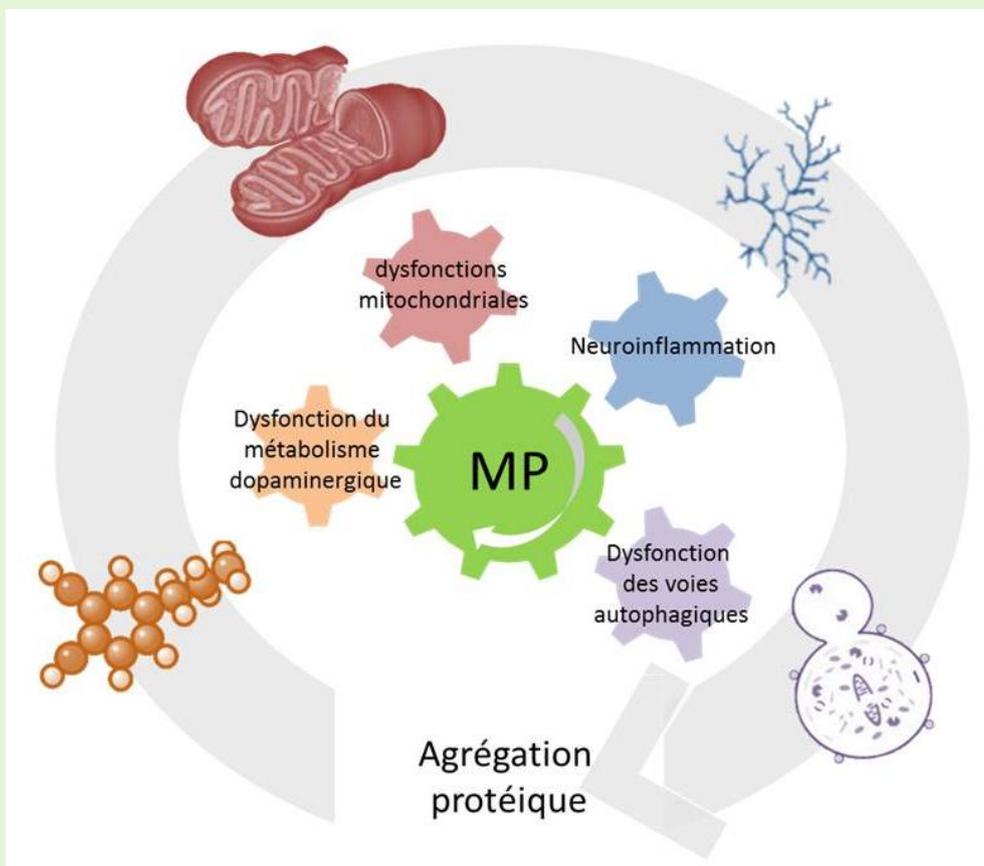


Figure 9: Physiopathologie des mécanismes mis en jeu dans la MP

La MP est caractérisée par une perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* associée à l'apparition de signes cliniques non moteurs, avant-coureurs de la pathologie, plus fins à déceler que les symptômes moteurs arrivant plus tardivement. Sur le plan neuropathologique, la MP est caractérisée par la présence de corps de Lewy composés essentiellement d' α -synucléine.

Bien qu'il soit suggéré qu'un dysfonctionnement du métabolisme dopaminergique, un dysfonctionnement mitochondrial, une neuroinflammation, ainsi qu'un dysfonctionnement des voies autophagiques semblent être mis en jeu dans la MP, le scénario précis de leurs implications dans la progression de la pathologie restent méconnus. La notion que ces différents mécanismes pourraient coopérer mutuellement dans l'initiation de la mort neuronale et dans la formation des agrégats d' α -synucléine est aussi à envisager (Michel et al., 2016).

2 SYNUCLEINE

2.1 LES DIFFERENTS DOMAINES ET LEURS FONCTIONS

2.1.1 LES DIFFERENTS DOMAINES

L' α -synucléine est une protéine de 14 kDa composée de trois régions. La première est une région amphipathique (N-term : résidus 1 à 60) où sont localisées les mutations pathogéniques, ainsi que quatre répétitions imparfaites de 11 acides aminés contenant un motif hexamérique hautement conservé (KTKEGV). L'alternance de résidus hydrophobes est propice à la formation d'hélices α amphipathiques. La région centrale est dite NAC pour « non-amyloïde-component » (résidus 61 à 95). Cette région, riche en acides aminés hydrophobes, est essentielle à la fibrillation et à la formation des CL (Giasson et al., 2001). Le troisième domaine (carboxy-terminal) est constitué d'une terminaison acide car riche en proline, aspartate et glutamate (résidus 96 à 140) (Figure 10). Ce domaine contient la majorité des modifications post-traductionnelles. Cette région C-terminale est aussi montrée comme étant impliquée dans la majorité des interactions avec les protéines (Giasson et al., 2003; Jensen et al., 1999) ainsi qu'avec les ions métalliques (Brown, 2007; Paik et al., 1999).

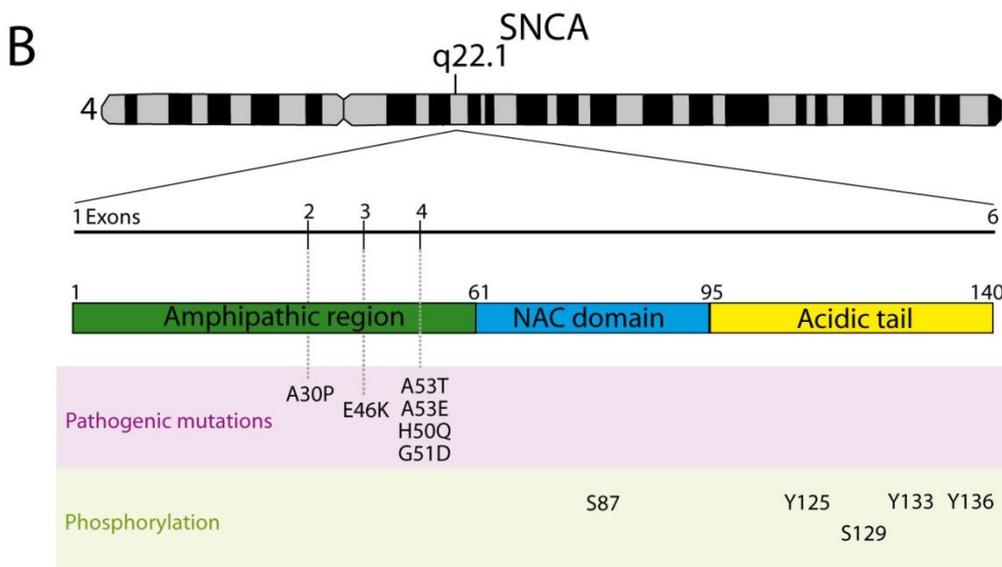


Figure 10: Structure de l' α -synucléine.

L' α -synucléine codée par le gène SNCA est composée de trois domaines. Le domaine amphipathique (en vert), le domaine dit « non-amyloïde-component » (NAC, en bleu) et une terminaison riche en proline (en jaune).

2.1.2 LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

L'α-synucléine subit diverses modifications post-traductionnelles. Celles-ci peuvent influencer sur sa structure tri-dimensionnelle et donc sur ces capacités d'agrégation.

2.1.2.1 SITES DE PHOSPHORYLATION

Plusieurs sites de phosphorylation ont été décrits *in vivo* et *in vitro* (S87, Y125, S129, Y133, Y135, Y136) (Fujiwara et al., 2002; Negro et al., 2002; Paleologou et al., 2010).

La phosphorylation sur la sérine 129 (pS129) est de loin la plus étudiée. Elle a été décrite pour la première fois par Fujiwara et collaborateurs en 2002 (Fujiwara et al., 2002). Des études biochimiques et immunohistologiques ont montré que la S129 est hautement phosphorylée dans le cerveau de patients atteints de la MP. En conditions physiologiques, seulement une faible fraction d'α-synucléine est constitutivement phosphorylée (environ 4 %) tandis qu'une augmentation drastique est observée dans le cerveau des patients atteints de Synucléopathie (Anderson et al., 2006; Saito et al., 2003). Cette augmentation est de même observée dans les modèles animaux surexprimant l'α-synucléine sauvage ou mutée, indiquant le rôle de cette phosphorylation dans le processus d'agrégation (Neumann et al., 2002). *In vivo* et *in vitro*, la phosphorylation sur la S129 influence la localisation cytoplasmique ou nucléaire de l'α-synucléine suggérant que la phosphorylation agirait comme un signal de translocation au noyau (Gonçalves and Outeiro, 2013). Cette phosphorylation servirait d'interrupteur pour contrôler les interactions de l'α-synucléine avec ses partenaires et donc pour moduler ses fonctions. Ainsi, la pS129 augmente l'interaction avec Rab8a, une Rab GTPases impliquée dans la coordination des vésicules de trafic (Yin et al., 2014). Par ailleurs, nombreux sont les laboratoires qui visent à déterminer si cette phosphorylation est un biomarqueur prédictif de l'évolution de la pathologie (Oueslati, 2016; Wang et al., 2012b). Les modulateurs de cette phosphorylation sont par ailleurs très étudiés, comme les polo-like kinase (PLKs), les caseines kinase (CKs) et les protéines kinases couplées aux récepteurs G (GRKs) (Dzamko et al., 2014).

Plusieurs autres sites potentiels de phosphorylation ont été identifiés, notamment la phosphorylation sur la sérine en position 87 (S87). Ce site est plus phosphorylé dans les cerveaux de patients atteints de pathologies neurodégénératives comme les démences à corps de Lewy et les patients atteints d'AMS (Paleologou et al., 2010) et dans un modèle

transgénique de Synucléopathie (Amschl et al., 2013). L'étude de Paleologou et collaborateur montre, de plus, que cette phosphorylation altère la liaison de l' α -synucléine avec les membranes plasmiques et diminue son affinité avec les vésicules lipidiques. Ces résultats suggèrent que la pS87 modifierait la conformation tridimensionnelle de l' α -synucléine, modifiant ainsi ses propriétés.

2.1.2.2 TRONCATION

L' α -synucléine est clivée en positions 120, 110, 115, 119, 122, 133, et 135 (Anderson et al., 2006; Li et al., 2005). Des formes tronquées de l' α -synucléine sont retrouvées dans les CLs (Baba et al., 1998; Campbell et al., 2001). Les troncations dans la partie C-terminale sont responsables d'un changement de charge de la protéine en retirant les charges négatives. Dans des études *in vitro*, ces troncations semblent faciliter l'agrégation (Hoyer et al., 2004; Liu et al., 2005; Murray et al., 2003). En effet, la forme tronquée (1-110) facilite l'agrégation de la forme entière de l' α -synucléine (Ulusoy et al., 2010).

2.1.2.3 UBIQUITINYLATION

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle présentant plusieurs fonctions. La plus connue est l'adressage de la protéine à la dégradation par le protéasome. Cette modification induit la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine (8 kDa) sur une ou plusieurs lysines acceptrices de la protéine cible. Différents degrés d'ubiquitylation (mono- ou poly-ubiquitylation) existent, permettant différentes traductions de ce signal pour la cellule. La mono-ubiquitylation de la chromatine induit des signaux de réparation de l'ADN, un marquage épigénétique de la chromatine ou la régulation de la localisation cellulaire sans pour autant induire la dégradation de la protéine ubiquitylée. En revanche, une protéine poly-ubiquitylée entraîne son adressage au protéasome pour dégradation. Les niveaux d'ubiquitylation peuvent être détectés par immunohistochimie ou immunoempreinte (western blot), en permettant d'évaluer combien de molécules d'ubiquitine sont fixées à la protéine. Chez les patients atteints de DLB, la majorité des CLs corticaux sont doublement positifs pour le marquage ubiquitine et pour l' α -synucléine (Gómez-Tortosa et al., 2000; Sampathu et al., 2003; Spillantini et al., 1998). Par diverses techniques biochimiques, il a été montré que l' α -synucléine était en majorité mono- et di-ubiquitylée et, en moindre proportion, poly-ubiquitylée dans le CLs de cerveaux de

patients (Sampathu et al., 2003). Les mêmes modifications sont observées chez des souris transgéniques exprimant la forme humaine de l' α -synucléine mutée A53T (Sampathu et al., 2003). *In vitro*, l'ubiquitinylation de l' α -synucléine est un évènement postérieur à la formation de fibrilles d' α -synucléine. Ainsi, l'ubiquitinylation des fibrilles d' α -synucléine ne serait pas suffisante pour un adressage efficace au protéasome (Sampathu et al., 2003). Une deuxième hypothèse serait liée à la dysfonction du système du protéasome dans les Synucléopathies, suggérant que celui-ci ne serait plus capable de dégrader efficacement l' α -synucléine agrégée (McNaught and Jenner, 2001).

2.1.2.4 OXYDATION/NITRATION

L' α -synucléine est sujette à des modifications oxydatives, notamment des nitrations sur les résidus T39, T125, T133, T136. Ces modifications sont induites par des interactions avec des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives nitrogénées. Elles sont présentes dans les corps de Lewy, suggérant un rôle de ces modifications dans la pathogenèse des synucléinopathies (Benner et al., 2008; Giasson et al., 2000). L' α -synucléine, en condition native, prend une conformation riche en hélices α lui permettant de se lier aux membranes, mais la nitration augmente la formation de feuillets β qui sont favorables à la formation d'oligomères. Ce changement de conformation est associé à une réduction de la capacité du protéasome à dégrader l' α -synucléine, augmentant ainsi son temps de demi-vie (Hodara et al., 2004; Uversky et al., 2005). Cette modification induit aussi une redistribution anormale de l' α -synucléine, réduisant sa capacité à se lier aux membranes et induisant une augmentation de sa concentration dans le cytosol, favorisant ainsi la formation d'oligomères (Danielson et al., 2009; Liu et al., 2011).

2.1.2.5 ACETYLATION

L'acétylation de protéines est une des modifications post-traductionnelles la plus répandue dans les cellules eucaryotes. En effet, plus de 90% des protéines sont acétylées dans leur partie N-terminale (Arnesen et al., 2009). Physiologiquement, l' α -synucléine possède plusieurs sites d'acétylation dans sa partie N-terminale. En revanche, l'implication de ses sites d'acétylation dans la fonction de l' α -synucléine est très peu connue (Bartels et al., 2011). La partie N-terminale de l' α -synucléine est connue pour permettre sa liaison aux membranes lipidiques. Il est proposé que ces acétylations modulent l'agrégation de l' α -

synucléine en modulant sa localisation cellulaire, affectant positivement l'affinité de l' α -synucléine pour les phospholipides des membranes (Iyer et al., 2016). Les acétylations participeraient à la stabilisation de la structure α -hélicoïdale de la partie N-terminale de l' α -synucléine, état non favorable à l'agrégation (Bartels et al., 2014; Dikiy and Eliezer, 2014).

2.2 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES VS PATHOLOGIQUES

La fonction physiologique de l' α -synucléine reste encore peu décrite et mal connue. La majorité des études se concentrent sur ses aspects pathologiques, principalement dans la MP de par sa capacité à s'agréger et à former les CLs et les NLS. Les synucléines sont retrouvées uniquement chez les vertébrés (George, 2002). L'homologie de séquence entre les différentes espèces de vertébrés est majoritairement portée par la partie N-terminale avec une variabilité importante pour la partie C-terminale. Les α -synucléines humaines et murines partagent ainsi 95 % d'identité, seuls 7 acides-aminés divergent. De manière intéressante, l'acide aminé physiologique chez le rongeur en position 53 est une alanine (A), alors que chez l'Homme il s'agit d'une thréonine (T). Chez l'Homme, cette substitution A53T correspond à une mutation pathologique responsable d'une forme familiale de la MP. La détermination de ses fonctions passe par l'étude de la localisation de l' α -synucléine.

2.2.1 EXPRESSION ET LOCALISATION

L' α -synucléine est exprimée majoritairement au niveau du système nerveux central où sa concentration représente environ 1 % des protéines totales dans certaines régions du cerveau, notamment dans le néocortex, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le striatum, le thalamus et le cervelet (Iwai et al., 1995). Les données récentes de transcriptomique dans les différentes régions cérébrales chez l'homme et les rongeurs montrent que les niveaux d'expression des ARNm de l' α -synucléine dans la substance noire sont élevés, supérieurs par exemple à ceux du striatum (Allen Brain Atlas). La localisation sub-cellulaire de l' α -synucléine varie selon la population neuronale et 15 % de l' α -synucléine est liée aux membranes (Zhang et al., 2008). Bien que l'on retrouve cette protéine majoritairement au niveau des terminaisons pré-synaptiques, elle peut être détectée dans le noyau, dans le cytoplasme ainsi qu'associée à la membrane mitochondriale dans les neurones dopaminergiques (Iwai et al., 1995; Liu et al., 2009a; Yu et al., 2007).

Au cours du développement, l' α -synucléine est très régulée. Chez les rongeurs, son expression apparaît dans les stades tardifs du développement embryonnaire. Dans les premières semaines post-natales, un pic d'expression est observé, suivi d'une diminution progressive, ce qui suggère un rôle de l' α -synucléine dans la synaptogenèse (Petersen et al., 1999).

Au niveau périphérique, elle est exprimée dans les plaquettes, les cellules hématopoïétiques, les cellules des jonctions neuromusculaires, les muscles squelettiques, le tissu cardiaque et les oligodendrocytes. Son rôle dans ces cellules n'est pas très décrit (Norris et al., 2004). Récemment, la présence dans les neurones mésentériques de LB et de synucléine a fait l'objet d'études particulières, dans le contexte de l'hypothèse de propagation de la synucléinopathie des intestins vers le SNc (Derkinderen et al., 2011).

2.2.2 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES

2.2.2.1 FONCTIONS SYNAPTIQUES

Chez la souris, la délétion de l' α -synucléine n'induit que de faibles altérations au niveau synaptique (Cabin et al., 2002; Martín et al., 2004), ainsi que dans le trafic et le métabolisme des acides gras (Barceló-Coblijn et al., 2007; Castagnet et al., 2005; Golovko et al., 2007). La partie N-terminale et la partie C-terminale se lient aux phospholipides et à la synaptobrevine-2 respectivement, l' α -synucléine jouerait un rôle dans l'assemblage des vésicules synaptiques, régulant ainsi la libération des neurotransmetteurs, rôle compatible avec sa localisation synaptique (Burré et al., 2010) (**Figure 11**). De plus, un bon nombre de ses partenaires sont largement impliqués dans les fonctions synaptiques, comme les protéines du complexe SNARE (Burré et al., 2010, 2012), les protéines Rab3 (Chen et al., 2013), synapsine III (Zaltieri et al., 2015), VMAT2 (Guo et al., 2008) et les transporteurs à la sérotonine (Swant et al., 2011; Wersinger et al., 2006). En revanche, son expression restreinte au règne des vertébrés suggère que sa présence à la synapse n'est pas essentielle pour leur développement et leur fonctionnalité.

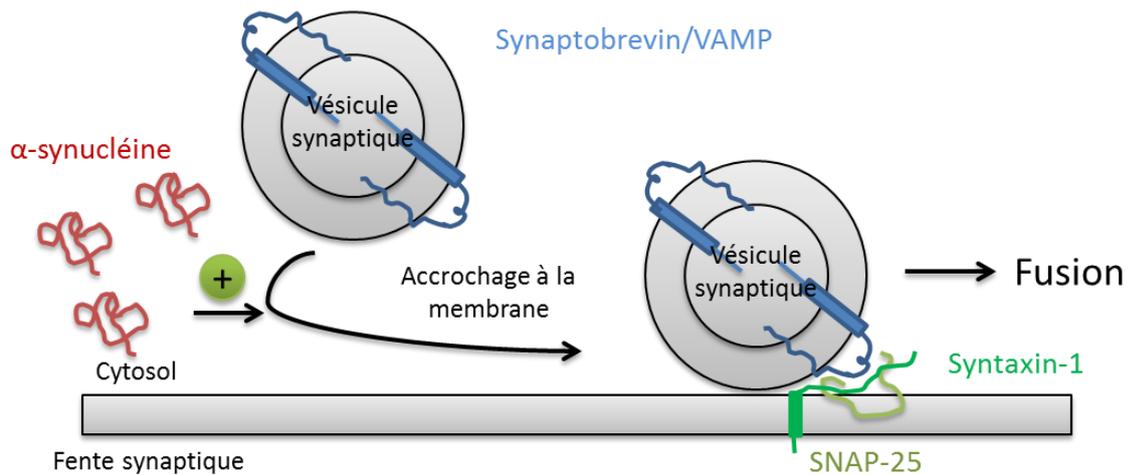


Figure 11: Fonctions physiologiques au niveau synaptique de l' α -synucléine

A la synapse l' α -synucléine favorise l'accrochage des vésicules synaptiques à la membrane plasmique, favorisant ainsi l'exocytose des vésicules. Adapté de (Lashuel et al., 2013).

2.2.2.2 METABOLISME DE LA DOPAMINE

De manière intéressante, l' α -synucléine régule la synthèse de la dopamine en inhibant directement la tyrosine hydroxylase. Comme décrit dans la partie 1.2.1.2, la tyrosine hydroxylase, lorsqu'elle est phosphorylée, catalyse la transformation de L-tyrosine en L-dopa. L' α -synucléine se lie à la TH empêchant ainsi sa phosphorylation. Elle agit aussi indirectement en se liant à la protéine 14-3-3. De plus, elle empêche la protéine 14-3-3 de stimuler la TH pour la synthèse de dopamine. Cette séquestration inhiberait aussi d'autres fonctions relatives aux protéines 14-3-3 telles que l'inhibition de l'apoptose via Bcl2 (Ostrerova et al., 1999; Xu et al., 2002). De plus, elle active la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui induit la déphosphorylation de la TH et donc son inactivation (Lou et al., 2010; Perez et al., 2002). Comme énoncé plus haut (partie phosphorylation), l' α -synucléine est phosphorylée en S129. Cette phosphorylation pathologique réduit la capacité de l' α -synucléine à inactiver la TH ainsi qu'à activer la protéine phosphatase 2A (Lou et al., 2010) (Figure 12).

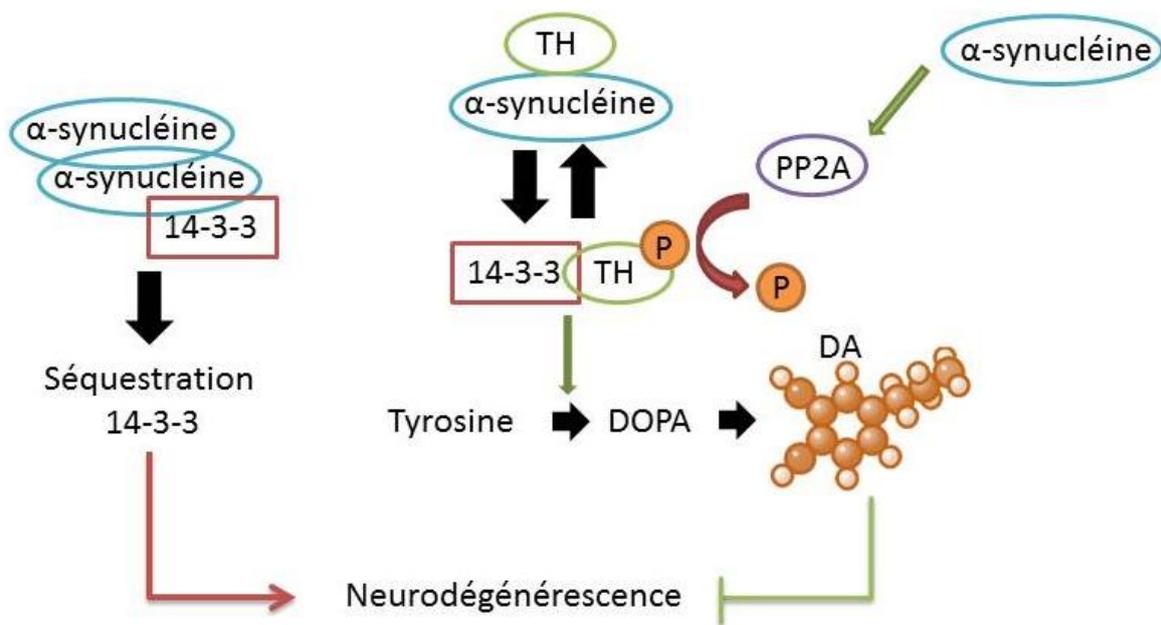


Figure 12: Fonctions physiologiques de l' α -synucléine sur le métabolisme de la dopamine.

L' α -synucléine se lie à la TH empêchant ainsi sa phosphorylation. Elle agit aussi indirectement en séquestrant la protéine 14-3-3, favorisant la neurodégénérescence. De plus, elle active la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui induit la déphosphorylation de la TH et donc son inactivation.

2.2.2.3 PROPAGATION

L'évolution de la distribution des corps de Lewy dans le cerveau proposée par Braak et collaborateurs suggère que l' α -synucléine est capable de passer d'aire cérébrale en aire cérébrale, au cours du temps, par un mécanisme à ce jour inconnu. Similairement à d'autres maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer, des mécanismes dits « de type prion » sont envisagés pour l' α -synucléine (Jucker and Walker, 2013). Les prions, pour « PRoteinaceous Infection ONLY particule », ont été définis pour la première fois en 1982 par Stanley Prusiner. Un prion est un type d'agent pathogène de nature uniquement protéique, ne reposant sur aucun acide nucléique. Chez l'Homme, la protéine PrP (Protease resistant Protein) est responsable des maladies à prions comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob. La protéine PrP cellulaire (PrPc) devient pathologique (PrPs, Scrapie) à la suite d'un changement conformationnel et adopte une conformation riche en feuillets β , susceptible de former des fibres de type amyloïde qui, à son tour, peut propager la pathologie, en

induisant la transconformation de PrP^c and PrP^s. Le même phénomène existe-il pour l' α -synucléine ?

Plusieurs travaux expérimentaux chez l'animal suggèrent que l' α -synucléine agrégée (sans être résistante à la protéinase K) pourrait se comporter comme la PrP. Par exemple, les travaux de Luk et collaborateurs montrent que l'injection intrastriatale, chez la souris, de fibrilles d' α -synucléine préformées induit une agrégation de l' α -synucléine de rongeur (endogène) dans les régions anatomiquement connectées au striatum ainsi qu'une dégénérescence de la substance noire. Cet effet n'est pas observé chez des souris KO pour l' α -synucléine, suggérant une transconformation de l' α -synucléine endogène par les fibrilles injectées (Luk et al., 2012a). La notion de « souches » comme pour les prions est aussi apparue pour l' α -synucléine, suggérant des propriétés différentes de recrutement et de propagation des agrégats d' α -synucléine (Bousset et al., 2013; Melki, 2015).

Le mécanisme par lequel l' α -synucléine passe de cellule en cellule n'est pas décrit. Plusieurs hypothèses sont évoquées et étudiées, notamment le passage de cellule en cellule par endocytose, par une diffusion à travers la membrane n'impliquant pas de transporteurs, par un mécanisme trans-synaptique et enfin par un récepteur qui permet son passage (Danzer et al., 2011; Lee et al., 2008). Dans le cytoplasme, les monomères d' α -synucléine adoptant une conformation mépliés ont la capacité d'interagir ensemble de façon transitoire, pour former des dimères instables. L'ajout de nouveaux monomères au dimère conduit à la formation d'oligomères de taille et de morphologie variables, qui, en incorporant de nouveaux monomères deviennent des fibrilles de type amyloïde adoptant une conformation riche en feuillets β . La formation de fibrilles conduit à la formation de CLs. *In vitro*, il a été démontré que les fibrilles d' α -synucléine sont captées par le neurone, puis transportées de manière antérograde dans l'axone, puis relâchées dans le milieu pour être de nouveau captées par un autre neurone (Freundt et al., 2012). Dans la nouvelle cellule hôte, l' α -synucléine en conformation pathologique va pouvoir induire la transconformation d' α -synucléine correctement conformée, propageant ainsi la pathologie (Figure 13).

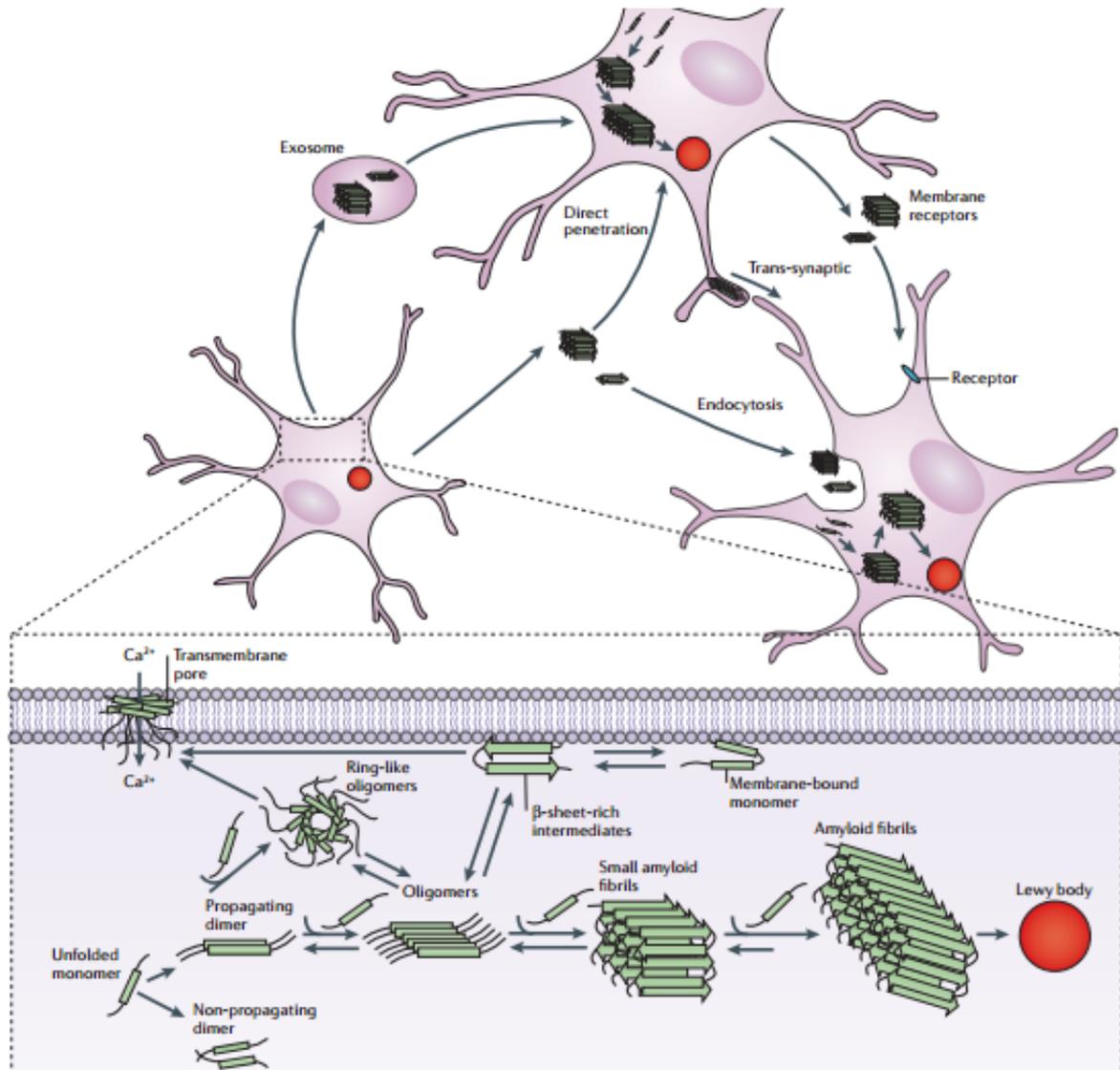


Figure 13: Hypothèse prion de propagation pour l' α -synucléine.

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer la propagation de l' α -synucléine de cellule en cellule, notamment l'hypothèse d'une propagation par un mécanisme semblable au mécanisme impliqué dans la propagation du prion (Lashuel et al., 2013).

3 LRRK2

3.1 SA LOCALISATION

Chez la souris et chez l'homme, il a été montré par des analyses transcriptomiques (expériences d'hybridation *in situ* chez la souris et analyses biopuces sur régions cérébrales disséquées) que l'ARNm de LRRK2 (leucine rich repeat kinase 2) est très exprimé dans les structures liées à la transmission dopaminergique, ce qui inclut, le cortex frontal ainsi que le caudé-putamen (**Figure 14**). En revanche, l'ARNm est retrouvé en moindre quantité dans la substance noire (Galter et al., 2006). L'ARNm de LRRK2 se trouverait en particulier dans les neurones DA à neuromélanine, les plus sensibles dans la MP (Higashi et al., 2007). En accord avec ces données d'hybridation *in situ*, l'utilisation de différents anticorps a montré que la protéine LRRK2 était retrouvée dans le cortex cérébral, le caudé-putamen, et la substance noire. En condition pathologique, il a été montré que l'immunoréactivité de LRRK2 était significativement réduite dans la substance noire de patients atteints de la MP (Higashi et al., 2007). LRRK2 a été retrouvée à la périphérie des corps de Lewy. En 2011, Sharma et collaborateurs ont étudié la localisation de LRRK2 (ARNm et protéines) dans plusieurs régions cérébrales. Ils ont ainsi pu montrer une faible expression de LRRK2 dans la substance noire comparée à d'autres régions. Chez la souris, la protéine est retrouvée au niveau du striatum et dans le bulbe olfactif où l'expression est forte, ainsi que dans le cortex cérébral et la substance noire, où l'expression est plus faible (Biskup et al., 2006; West et al., 2014). Chez le rat, les niveaux d'expression dans la substance noire serait possiblement encore plus faible (West et al., 2014) (**Figure 14**).

Dans la cellule, LRRK2 est majoritairement exprimée au niveau du cytoplasme (Sharma et al., 2011). LRRK2 est aussi détectée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie ainsi qu'aux membranes des lysosomes, des endosomes, et des vésicules de transport associée aux radeaux lipidiques (Biskup et al., 2006; Hatano et al., 2007).

Sa localisation est encore le sujet de nombreuses études. Ainsi, pour une meilleure connaissance de l'expression de LRRK2, la fondation Michael J. Fox (MJFF) a financé en 2014 un projet mondial conduit par 5 chercheurs (Professeurs Nichols, Holton, Halliday, Murayama, Dzamko) afin de déterminer les régions cérébrales et les populations exprimant

LRRK2 dans des cerveaux de patients atteints de la MP mais aussi dans des cerveaux de sujets témoins.

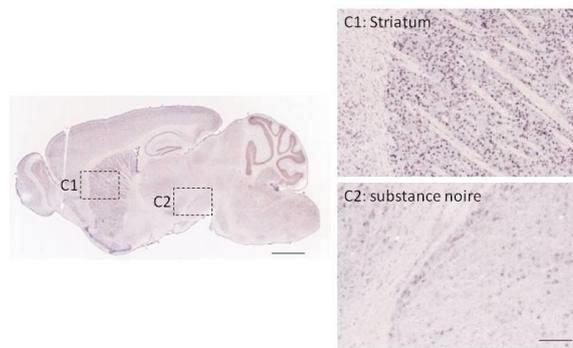


Figure 14: Expression de LRRK2 dans le cerveau chez la souris.

Photographies de coupes sagittales d'un cerveau de souris (post-natal P56) montrant la répartition de l'ARNm codant pour LRRK2 par hybridation in situ (HIS) dans le striatum (C1) et la substance noire (C2). Source : Allen brain atlas, <http://mouse.brain-map.org/experiment/show/73497609>

En périphérie, les analyses protéomiques faites chez l'Homme montrent que la protéine LRRK2 est très exprimée, notamment au niveau des reins, des poumons et du foie (source proteinatlas, **Figure 15**). Son rôle en périphérie n'est que très peu étudié (Looyenga et al., 2011).

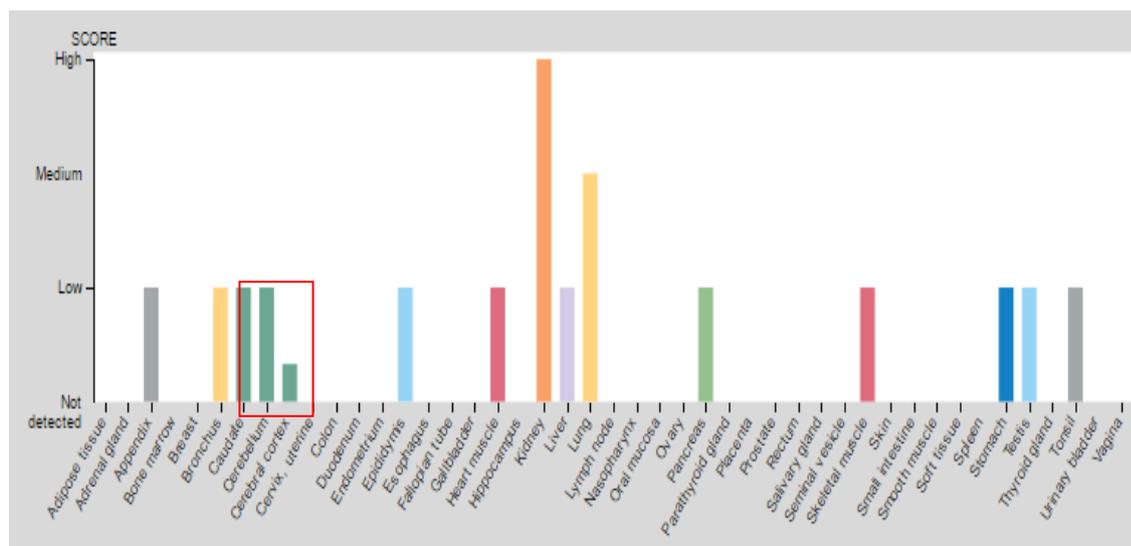


Figure 15: Relevé de l'expression protéique de LRRK2 en fonction des organes étudiés

Source: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000188906-LRRK2/cell#rna>

3.2 LES DIFFERENTS DOMAINES ET LEURS FONCTIONS

3.2.1 DANS LES GRANDES LIGNES

Le gène humain codant pour LRRK2 est composé de 51 exons. Il code pour une protéine de 2527 aa possédant plusieurs domaines fonctionnels. LRRK2 possède une activité kinase, et une activité catalytique GTPasique. Peu de protéines possèdent cette double fonction catalytique. Ces deux domaines catalytiques sont entourés par des domaines d'interaction protéine/protéine. De par la présence des différents types de domaines, LRRK2 fait partie de plusieurs familles de protéines (Armadillo, WD40, MAPKKK...).

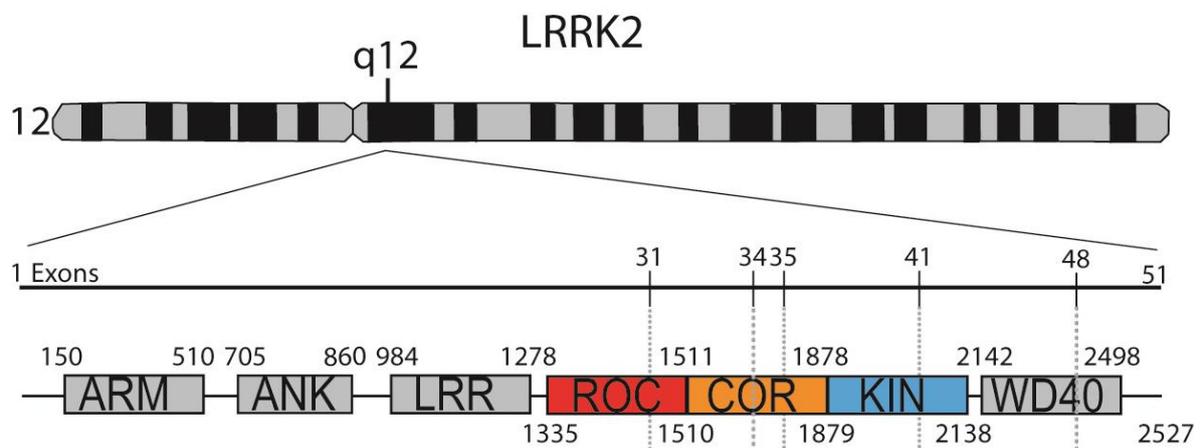


Figure 16: Les différents domaines de la protéine LRRK2.

ARM : armadillo, ANK : Ankyrine, LRR : Leucin-rich repeat, ROC : Ras-of-complex proteins, COR: C-terminal part of ROC, KIN: Kinase, WD-40: motif structurel long d'environ 40 résidus et terminé par le dipeptide tryptophane-aspartate (codés respectivement par un W et un D).

3.2.2 LES DOMAINES D'INTERACTION PROTEINE/PROTEINE

3.2.2.1 LE DOMAINE ARMADILLO

LRRK2 fait partie de la famille des protéines à répétition armadillo, tout comme la protéine β -caténine ou encore l'importine- α . Cette famille est retrouvée chez tous les eucaryotes et se caractérise par la présence d'un tandem de répétitions d'unités armadillo plus ou moins grand. Le domaine armadillo de LRRK2 est situé dans la partie N-terminale de la protéine

(aa150 à 510) et a été pour la première fois décrit par Marin et collaborateurs (Marín, 2006). Treize répétitions armadillo sont décrites dans la protéine LRRK2, chacune composée d'approximativement 42 résidus (Mills et al., 2012). Ces répétitions contiennent 3 segments en hélice- α . De manière très intéressante, il a été montré qu'un sous-type de la famille des protéines à répétition de domaines ARM possède, en plus du domaine armadillo, un domaine kinase. L'ajout d'un domaine d'interaction armadillo en plus du domaine kinase pourrait représenter un avantage évolutif, en jouant un rôle stabilisateur dans l'interaction avec la protéine cible de la kinase et en facilitant la phosphorylation de la cible (Tewari et al., 2010).

3.2.2.2 LE DOMAINE ANKYRINE

Le nom ankyrine vient d'un mot Grec dont la traduction veut dire « fusion ». Le motif ankyrine a été décrit en premier lieu pour décrire des protéines d'adaptation (dites protéines ankyrine). Elles interviennent dans la fixation de protéines membranaires à la spectrine/actine du cytosquelette afin de maintenir l'intégrité des membranes plasmiques et pour ancrer spécifiquement des canaux ioniques, des échangeurs d'ions et des transporteurs d'ions dans la membrane plasmique. Les protéines ankyrines contiennent 4 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal qui contient 24 répétitions en tandem d'environ 33 résidus composant le domaine de répétition ankyrine, un domaine central qui se lie à la spectrine et un domaine se liant aux protéines d'apoptose et un domaine C-terminal très variable entre les différentes ankyrines. Les répétitions ankyrines sont responsables de la reconnaissance d'un large éventail de protéines membranaires et représentent une des plateformes d'interaction protéine/protéine les plus communes (Michaely et al., 2002). Les protéines contenant des répétitions de type ankyrine contiennent généralement 5 à 6 répétitions du motif ankyrine. LRRK2 contient 7 répétitions du motif ankyrine. Chaque répétition s'assemble pour former deux hélice- α anti-parallèles liées par une boucle en épingle à cheveu β (hairpin) (Mills et al., 2012).

3.2.2.3 LE DOMAINE LEUCINE-RICH REPEAT

Comme son nom l'indique, LRRK2 fait partie de la classe des Leucine-rich repeat (LRR) protéines. Le terme LRR représente un motif structural formant un repliement en forme de fer à cheval, dont l'intérieur est formé de feuillet β parallèles et l'extérieur est formé d'un

réseau d'hélices α . Vingt à trente acides aminés sont répétés formant des segments. Ces segments sont riches en un acide aminé hydrophobe, la leucine, et se lient les uns aux autres pour former un domaine protéique en forme de solénoïde. Neuf résidus formant les segments sont hautement conservés (LxxLxLxxN/CxL) correspondant au feuillet β suivi d'une partie plus variable (Buchanan and Gay, 1996; Kobe and Deisenhofer, 1995). Les leucines ainsi que les autres résidus hydrophobes forment le corps hydrophobe du domaine. A ce jour, sept différentes familles de LRR sont identifiées en fonction du nombre de répétitions ainsi que par la séquence de répétition qui peut varier. Il a été montré que LRRK2 compte 14 LRRs dont 13 qui suivent les séquences consensus des LRRs protéines. Ce domaine est souvent impliqué dans la formation des interactions protéine/protéine (Vancaenenbroeck et al., 2012). Les motifs LRR ont été identifiés dans un grand nombre de protéines aux fonctions biologiques très diversifiées. La plus connue des protéines à domaine LRR est l'inhibiteur de ribonucléase.

3.2.2.4 LE DOMAINE WD40

La partie C-terminale de LRRK2 se termine par un domaine WD40. Le domaine WD40 est un motif structurel long d'environ 40 résidus et souvent terminé par le dipeptide tryptophane-aspartate, deux acides aminés codés respectivement par un W et un D, d'où son nom (Li and Roberts, 2001).

Les protéines possédant un domaine WD40 comptent généralement entre 4 et 16 répétitions formant une structure dite *β -propeller*. Un domaine WD40 est constitué de plusieurs répétitions, une région variable d'une vingtaine de résidus suivie par un ensemble de résidus répétés moins variables. Ces répétitions forment un feuillet β à quatre brins antiparallèles appelé lame. Les lames s'assemblent pour former des *β -propeller*, comportant typiquement 7 lames.

Les protéines ayant une répétition WD40 forment une grande famille présente chez tous les eucaryotes et interviennent dans une grande variété de processus, allant de la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription au contrôle du cycle cellulaire, à l'autophagie et à l'apoptose. La fonction sous-jacente à toutes les protéines à domaine WD40 est de coordonner les assemblages complexes de protéines, dans lesquels les répétitions WD40 servent de structure rigide à la base des interactions protéine-protéine. La

spécificité des interactions est déterminée par la séquence entourant les répétitions (Li and Roberts, 2001).

La contribution de ce domaine dans la fonction de LRRK2 n'est que peu étudiée, néanmoins, il a été montré que ce domaine est nécessaire à la neurotoxicité de LRRK2 (Jorgensen et al., 2009). De plus, il semblerait important dans la liaison de LRRK2 aux vésicules synaptiques (Piccoli et al., 2014)

3.2.2.5 MUTATION DU DOMAINE WD40

La seule mutation du domaine WD40 est la mutation G2385R. Ce variant augmente le risque de déclencher la MP dans certaines populations, notamment, la population Asiatique (Fung et al., 2006). Dans certaines études, cette mutation entraîne une diminution de l'activité kinase de LRRK2 et donc une perte de fonction de la protéine (Jaleel et al., 2007; Rudenko et al., 2012) alors que d'autres études ont montré qu'elle n'avait pas d'effet sur l'activité kinase (Nichols et al., 2010; West et al., 2007).

3.2.3 LE DOMAINE ROC/COR (AA 1335 A 1878)

3.2.3.1 LA FONCTION GTPASIQUE

LRRK2 fait partie de la famille des ROCO protéines, tout comme, son homologue LRRK1, DAPK1 (death-associated protein kinase 1) et MASL1 (malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1) (Lewis, 2009). Les protéines de cette famille contiennent un domaine ROC (Ras-of-complex proteins) et un domaine COR (C-terminal part of ROC). Le domaine ROC est un domaine à activité GTPase. Il est suggéré que le domaine ROC est capable de réguler l'activité kinase de LRRK2, comme cela semble être le cas pour son homologue, LRRK1 (Korr et al., 2006). *In vitro*, la liaison du GTP au domaine ROC est nécessaire pour l'activité kinase de LRRK2. En revanche, l'activité kinase n'est pas nécessaire pour que LRRK2 puisse lier le GTP (Ito et al., 2007; Smith et al., 2006). La mutation d'un acide aminé de la poche GTPasique, très conservé et connu pour être essentiel à la liaison du GTP chez d'autres GTPases (T1348N), bloque la liaison du GTP et entraîne un arrêt de l'activité kinase de LRRK2. De plus, la phosphorylation de LRRK2 par d'autres kinases dépend de sa capacité à lier le GTP. Une autre étude a montré plus récemment, que ce n'est pas la liaison qui est

importante mais la capacité de liaison qui est primordiale, c'est-à-dire, une conformation tridimensionnelle, rendant la poche GTPasique accessible (Taymans et al., 2011).

3.2.3.2 LA DIMERISATION

Par des études *in vitro* d'immunoprécipitation, il a été montré que LRRK2 formait un dimère via le domaine ROC (Deng et al., 2008; Gloeckner et al., 2006; Greggio et al., 2008; Ito and Iwatsubo, 2012). De nombreuses protéines se dimérisent pour réguler leur fonction, ce processus étant notamment utilisé par certaines GTPases ainsi que par certaines kinases comme ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Bakkenist and Kastan, 2003; Gasper et al., 2009). Les dimères de LRRK2 sont essentiellement localisés à la membrane et sont présents dans la cellule en quantité nettement inférieure aux monomères (Berger et al., 2010). Néanmoins, la séparation du pool de LRRK2 lié à la membrane et du pool de LRRK2 libre dans le cytosol (à partir d'extrait de cellules en culture transfectées avec un plasmide codant pour LRRK2) a permis d'observer que le pool membranaire est beaucoup plus actif enzymatiquement que le pool cytosolique. Cette différence est similaire pour les formes sauvage et mutée de LRRK2 (Berger et al., 2010; Nichols et al., 2010; Sen et al., 2009). Cependant, la dimérisation n'est pas une étape indispensable pour son activité kinase basale (Ito and Iwatsubo, 2012). Grâce à une méthode qui permet de forcer la dimérisation, Ito and collaborateurs ont montré que l'activité kinase n'était pas augmentée. Le lien entre la dimérisation, l'activation et la translocation membranaire n'est pas clair et demande d'être mieux caractérisé.

3.2.3.3 LES MUTATIONS DU DOMAINE ROC/COR

Au sein du domaine ROC/COR, plusieurs mutations ont été identifiées: R1441G/H/C ; N1437H et Y1699C.

Les mutations du résidu arginine 1441, R1441G/H/C (glycine/histidine/cystéine) sont les plus couramment rencontrées après la mutation G2019S. La mutation R1441C a été décrite pour la première fois en 2004 par Zimprich et collaborateurs (Zimprich et al., 2004). Les individus porteurs de cette mutation présentent une pathologie similaire à la pathologie sporadique avec un âge d'apparition des premiers symptômes autour de 60 ans (Haugarvoll et al., 2008). Cette mutation est retrouvée au sein de diverses ethnies contrairement à la mutation

R1441G qui est prédominante dans le Pays basque. Les patients R1441C développent une dégénérescence de la substance noire accompagnée d'une gliose, ainsi que des corps de Lewy (Martí-Massó et al., 2009).

Expérimentalement, l'impact de cette mutation (R1441C/G) sur les activités enzymatiques de LRRK2 est discuté. Dans certaines études, cette mutation entraîne une diminution de l'activité GTPasique comparé à la protéine WT (Lewis et al., 2007). En opposition, West et collaborateurs, ont montré une augmentation de l'activité GTPasique (West et al., 2007). La même incertitude existe quant à l'impact de ces mutations sur l'activité kinase. Certaines études rapportent une augmentation de l'activité tandis que d'autres rapportent une diminution ou alors aucun effet (Greggio and Cookson, 2009) (Figure 17).

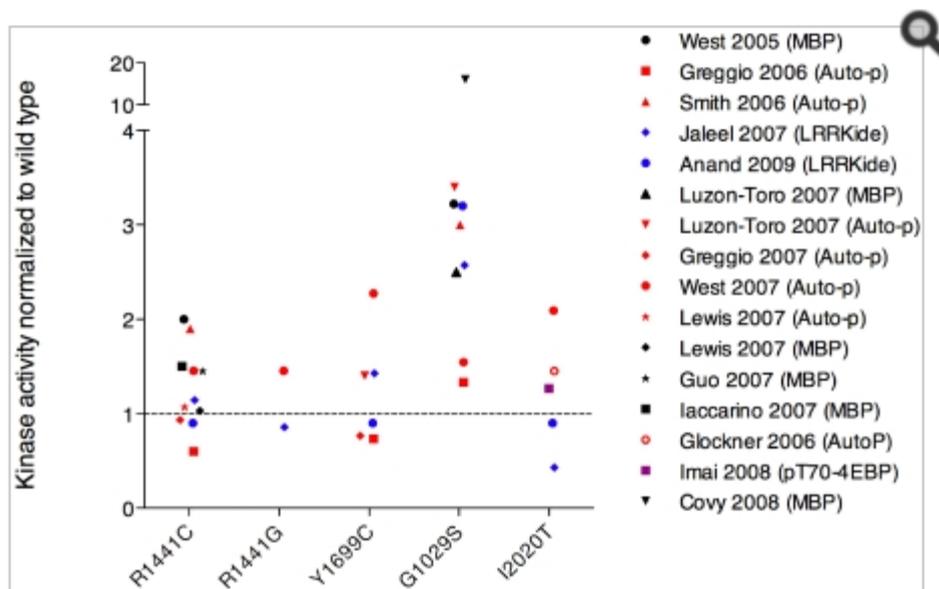


Figure 17: Impact des différentes mutations sur l'activité kinase de LRRK2

Graphique récapitulatif des différentes mesures de l'activité kinase en fonction des mutations étudiées et de la façon de les étudier. Selon le substrat utilisé pour le test kinase, MBP (myelin basic protein), LRRKtide (peptide substrat artificiel de LRRK2), 4E-BP (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, substrat de LRRK2), le résultat de la mesure de l'activité kinase n'est pas comparable. Rouge : autophosphorylation, bleu : LRRKtide, noir : MBP, violet : 4E-BP (Greggio and Cookson, 2009).

La mutation N1437H a été pour la première fois rapportée en 2010 dans deux familles norvégiennes (Aasly et al., 2010). C'est une mutation rare. Les patients porteurs de la mutation N1437H développent un parkinsonisme similaire aux patients atteints d'une forme sporadique avec en plus, une atrophie corticale, une dégénérescence de la substance noire accompagnée d'une gliose, une Synucléopathie (corps de Lewy) qui reste très éparse, ainsi qu'une immunoréactivité forte pour l'ubiquitine (Puschmann et al., 2012).

La mutation Y1699C est comme les 4 autres mutations du domaine ROC/COR, une mutation induisant un parkinsonisme comparable aux formes sporadiques. Cette mutation a été identifiée au Royaume-Uni. Les patients présentent des tremblements asymétriques, une rigidité et une instabilité posturale avec une bonne réponse à la L-Dopa. Les analyses immunohistologiques montrent une dégénérescence de la substance noire accompagnée d'une gliose (Khan et al., 2005).

3.2.4 LE DOMAINE KINASE DE LRRK2 (AA 1879 A 2138)

3.2.4.1 STRUCTURE

La protéine LRRK2 possède un domaine kinase dans sa partie C-terminale (a.a. 1879-2138). Les kinases peuvent être classifiées en trois groupes, les sérine/thréonine kinases, les tyrosines kinases et les kinases atypiques (Manning et al., 2002). LRRK2 est une serine/thréonine kinase. Dans le cas de LRRK2, dont la toxicité serait associée à l'augmentation de l'activité kinase, mieux comprendre comment le domaine kinase fonctionne est un enjeu important pour le développement de nouvelles thérapies potentielles.

L'architecture du domaine kinase se compose de deux lobes en hélice α connectés via une région charnière. Le site actif se situe dans la fente entre ses deux lobes. LRRK2 partage 51 % d'homologie avec la protéine mixed-lineage kinase 1 (MLK1) (Hudkins et al., 2008). Ceci permet de prédire la structure tridimensionnelle du domaine kinase de LRRK2 (Drolet et al., 2011). De manière intéressante, la boucle activatrice de la kinase semble différer par le motif DYG de ce qui est retrouvé chez les autres kinases (motif DFG), conférant à LRRK2 ses propriétés uniques. Le changement d'une phénylalanine par une tyrosine, qui est un résidu plus polaire en position 2018 chez LRRK2, induit certainement des changements dans la

flexibilité de la boucle activatrice, notamment lorsque la substitution G2019S sur le résidu suivant est présente, suggérant que ce changement peut impacter directement la capacité de LRRK2 à phosphoryler. Chez les kinases, le motif DFG est essentiel pour l'activité catalytique car le résidu Asp (D) est responsable de la liaison avec l'ATP directement ou indirectement via des ions magnésium. Le résidu Phe (F) est quant à lui responsable de la liaison hydrophobique avec le deuxième lobe du domaine. Cette particularité de LRRK2 est intéressante, notamment pour le développement de composés hautement spécifiques inhibant l'activité kinase de LRRK2.

3.2.4.2 LES MUTATIONS DU DOMAINE KINASE

Deux mutations pathogéniques sont identifiées dans le domaine kinase, la mutation I2020T et la mutation G2019S. La mutation I2020T a été mise en évidence par Funayama et collaborateurs en 2005, dans une famille japonaise à Sagamihara (Funayama et al., 2005). Cette mutation augmente l'activité kinase de LRRK2 de 40% par rapport à la protéine WT (Gloeckner et al., 2006). Les patients porteurs de la mutation I2020T présentent des symptômes neurologiques qui ne sont pas exclusifs à la MP, notamment la présence d'une pathologie Tau (hyperphosphorylation), plus généralement associée à la maladie d'Alzheimer. En revanche, ils présentent une perte des neurones de la substance noire mais la présence de corps de Lewy n'est pas systématiquement observée (Ujiie et al., 2012).

La mutation G2019S a été identifiée par Kachergus en 2005 (Kachergus et al., 2005). Cette mutation est la plus commune des formes génétiques de la MP, représentant environ 5% à 30% des cas dans certaines ethnies. De façon intéressante, 1-2% des patients atteints d'une forme sporadique de la MP présentent cette mutation (Gilks et al., 2005; Healy et al., 2008a). Les patients porteurs de cette mutation sont cliniquement identiques aux patients sporadiques et une dégénérescence de la substance noire ainsi que des corps de Lewy sont observés (Biskup and West, 2009; Gatto et al., 2013; Trinh et al., 2014; Yahalom et al., 2014). Cette mutation est responsable d'une augmentation de l'activité kinase de LRRK2 et, *in vitro*, elle entraîne une augmentation de l'activité kinase de l'ordre de 2/3 fois l'activité de la forme sauvage de LRRK2, en fonction du substrat utilisé, MBP ou LRRKtide (Greggio and Cookson, 2009). Cette augmentation serait responsable de la toxicité de cette protéine (Greggio et al., 2006; Lee et al., 2010a; Smith et al., 2006; West et al., 2005) (**Table 2**).

mutation	position	domaine	Corps de Lewy	Dégénérescence SN	NFT	références
R1441C	E31	ROC	+	+	+	(Tong and Shen, 2012)
R1441G	E31	ROC	-	+	-	(Martí-Massó et al., 2009)
R1441H	E31	ROC	NC	NC	NC	(Ross et al., 2009)
R1628P	E34	COR	NC	NC	NC	(Zhang et al., 2009)
Y1699C	E35	COR	+	+	+	(Pchelina et al., 2011)
G2019S	E41	Kinase	+	+	+	(Gatto et al., 2013; Healy et al., 2008b; Trinh et al., 2014)
I2020T	E41	Kinase	+/-	+	+	(Funayama et al., 2005; Hasegawa et al., 2009)
G2385R	E48	WD40	NC	NC	NC	(Di Fonzo et al., 2006)

Table 2: Table des mutations de LRRK2 (Li et al., 2014)

E : Exon, + : présence, - : absence, NC : non communiqué.

3.3 LA REGULATION DE LA PROTEINE

3.3.1 SES SITES DE PHOSPHORYLATION

LRRK2 est une protéine qui contient de nombreux sites de phosphorylation qui permettent la régulation de sa localisation, ainsi que la régulation de ses activités enzymatiques. Entre le domaine ANK et le domaine LRR dans la partie N-terminale, un cluster de sérines (S910 ; 935 ; 955 ; 973) qui sont constitutivement phosphorylées (Gloeckner et al., 2010; Lobbestael et al., 2012) a été identifié (**Figure 18**). Ce cluster est responsable de la liaison de LRRK2 à des protéines 14-3-3, ainsi que de l'activation des voies médiatrices de l'inflammation (Dzamko et al., 2013). Cette liaison est particulièrement dépendante du statut de

phosphorylation de la S910 et de la S935 (Li et al., 2011). Il semble que l'interaction entre LRRK2 et les protéines 14-3-3 protège les sérines 910 et 935 empêchant leur déphosphorylation et entraînant une stabilisation de la structure de LRRK2 (Nichols et al., 2010; Rudenko and Cookson, 2010). Il est suggéré que les protéines 14-3-3 influencent la capacité de dimérisation de LRRK2, connue pour moduler l'activité kinase de LRRK2 (détaillé dans la partie 3.2.3.2) (Sen et al., 2009). De manière intéressante, les protéines 14-3-3 sont des biomarqueurs détectés dans le liquide-céphalo-rachidien pour le diagnostic de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, qui est une maladie à prion (Hamlin et al., 2012). Nichols et collaborateurs ont mis en évidence qu'une réduction de la liaison de 14-3-3 avec LRRK2 conduisait à une accumulation de LRRK2 dans des pools cytoplasmiques (Nichols et al., 2010; Rudenko and Cookson, 2010). De plus, cette liaison semble être impactée par certaines mutations pathogéniques de LRRK2, notamment par la mutation R1441C/G/H ou encore la mutation du domaine WD40 G2385R (Nichols et al., 2010; Rudenko et al., 2012). A l'heure actuelle, les kinases responsables de la phosphorylation de LRRK2 ne sont pas identifiées, les données de la littérature n'étant pas toutes congruentes ou n'utilisant pas toutes les mêmes méthodes expérimentales. Les potentielles protéines impliquées dans la régulation, phosphorylation et dé-phosphorylation de LRRK2, sont résumées dans le **Table 3**.

En 2011, la MJFF a lancé un projet d'identification des phosphatases de LRRK2. Ce projet est co-administré par trois chercheurs, Jean-Mars Taymans (France), R. Jeremy Nichols (USA), Veerle Baekelandt (Belgique), et a été prolongé en 2013. Il vise à mieux comprendre la régulation de LRRK2 par ses phosphatases.

Protéine	Identification	Rôle potentiel	Références
Caséine kinase 2 (CK2)	Séquence prédictive de phosphorylation	Phosphorylation de LRRK2	(West et al., 2007)
PKA	Séquence prédictive de phosphorylation + test <i>in vitro</i>	Phosphorylation de LRRK2	(Ito et al., 2007; Li et al., 2011; West et al., 2007)
PKC	test <i>in vitro</i>	Phosphorylation de LRRK2	(Zach et al., 2010)
Sérine protéine kinase ataxia telangiectasia mutated (ATM)	Séquence prédictive de phosphorylation	Phosphorylation de LRRK2	(West et al., 2007)

Protéine phosphatase 1 (PP1)	test <i>in vitro</i>	Phosphatase de LRRK2	(Lobbestael et al., 2013)
Tyrosine phosphatase 23	Double-hybride chez la levure	Phosphatase de LRRK2	(Zheng et al., 2008)
protein phosphatase 6 (PPP6C)	In vitro	interacteur	(Häbig et al., 2008)
Myotubularin-related protein 12 (MTMR12)	In vitro	interacteur	(Häbig et al., 2008)
protéine phosphatase 2A (PP2A)	In vitro	Phosphatase de LRRK2	(Athanasopoulos et al., 2016)

Table 3: Liste des protéines suspectées de phosphoryler ou dé-phosphoryler LRRK2 (Lobbestael et al., 2012)

3.3.2 SES SITES D'AUTOPHOSPHORYLATION

Du fait que les kinases soient des régulateurs essentiels d'un nombre important de voies de transduction du signal, elles sont hautement régulées. Partant de l'observation que LRRK2 et la protéine Roco4 possèdent une architecture du domaine kinase très comparable, l'équipe du Dr. Gilsbach a fait l'hypothèse que les deux kinases pouvaient se comporter de la même façon (Gilsbach and Kortholt, 2014; Gilsbach et al., 2012). Une singularité très conservée entre les kinases réside en leur existence sous deux formes, un état dit « actif » et un état dit « inactif ». Ce passage entre ces deux états implique notamment l'autophosphorylation de la protéine pour passer d'un état à un autre. Ces autophosphorylations peuvent induire une réorientation de la boucle active mais elles peuvent aussi altérer la liaison de l'ATP à la protéine et/ou l'interaction avec les substrats.

LRRK2 est une protéine qui possède de nombreux sites d'autophosphorylation (Kamikawaji et al., 2009; Lobbestael et al., 2012; Webber et al., 2011). Six sites putatifs d'autophosphorylation sont présents dans le domaine LRR, tous orientés vers la face extérieure de la protéine (T1024, S1025, S1124, S1253, S1283, S1292). Un minimum de huit

sites d'autophosphorylation sont présents dans le domaine ROC et cinq sites dans le domaine kinase. L'activité d'autophosphorylation est relativement basse malgré tous les changements que cette activité semble impacter. Dans un test *in vitro*, Webber et collaborateurs ont montré que LRRK2 accumule 0.19 phosphates par molécule de LRRK2 en une heure. Lorsque LRRK2 porte la mutation G2019S, le nombre de phosphate incorporé est multiplié par deux (Webber et al., 2011). On considère souvent que l'autophosphorylation de LRRK2 reflète son activité kinase catalytique.

Le rôle de toutes ces autophosphorylations est peu connu mais ces modifications sont mises en cause dans la régulation de l'activité « ON/OFF » de la kinase. Ces sites putatifs ont été pour la plupart identifiés et validés *in vitro* mais n'ont pas été étudiés *in vivo* faute d'anticorps spécifiques reconnaissant les phospho-sites.

In vitro, le niveau de phosphorylation de la sérine 1292 est réduit en présence d'un inhibiteur de kinase spécifique de LRRK2 (G1023) aussi bien en culture d'une lignée cellulaire que de neurones primaires issus de souris transgéniques exprimant la mutation G2019S de LRRK2 (BAC transgénique). Dans cette même étude les auteurs ont montré que la phosphorylation de la sérine 1292 était augmentée par la présence des mutations I2020T et G2019S. La phosphorylation de cette sérine représente donc un excellent marqueur de l'activité kinase de LRRK2. Cette sérine 1292 semble jouer un rôle important car sa substitution expérimentale réduit beaucoup l'effet de la mutation G2019S, notamment sa toxicité et son augmentation d'activité kinase par rapport à la forme sauvage (Sheng et al., 2012).

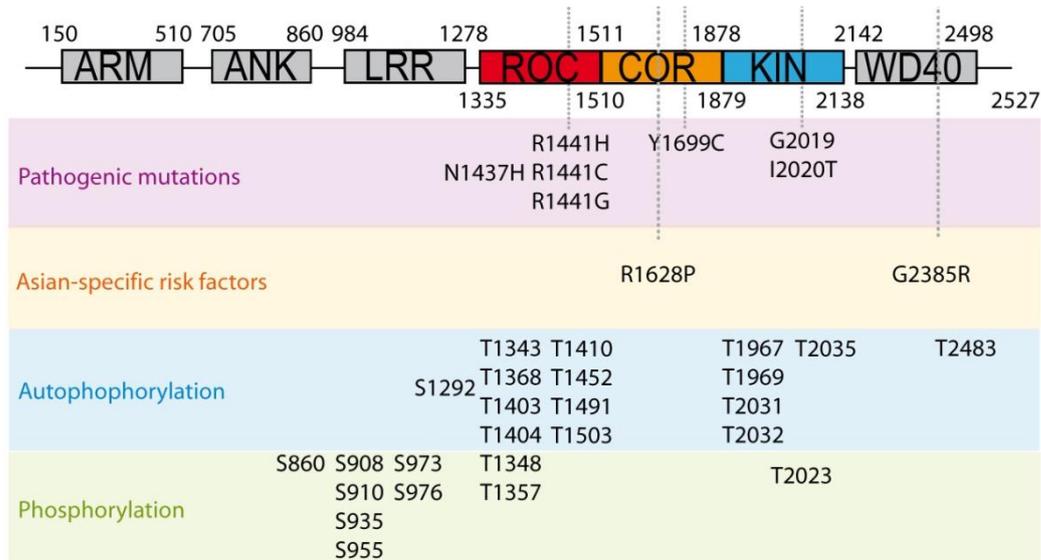


Figure 18: Structure de la protéine LRRK2

Les mutations pathogéniques sont présentées dans l'encadré violet, les mutations facteurs de risque dans l'encadré orange, les sites d'autophosphorylation dans l'encadré bleu et les sites de phosphorylation dans l'encadré vert (Esteves et al., 2014).

3.4 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LRRK2

Les fonctions physiologiques de LRRK2 sont très peu connues et résultent souvent de l'étude de ses fonctions pathologiques. Néanmoins, LRRK2 jouerait un rôle à différents niveaux dans la cellule, notamment de par ses interactions (**Figure 19**). De plus, LRRK2 étant une protéine qui possède plusieurs type d'activité (GTPasique, kinase, ...), il est probable que ces différentes activités enzymatiques impactent ses fonctions dans la cellule.

3.4.1 CYTOSQUELETTE

Les formes mutées de LRRK2 induisent des défauts au niveau du cytosquelette, notamment dans la morphologie des neurites (MacLeod et al., 2006; Parisiadou et al., 2009; Plowey et al., 2008; Ramonet et al., 2011; Tsika et al., 2014). Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que LRRK2 aurait un rôle dans la régulation du cytosquelette. Cette hypothèse est appuyée par le fait que LRRK2 interagit avec la tubuline et l'actine, deux constituants majeurs du cytosquelette (Gandhi et al., 2009; Gillardon, 2009; Meixner et al., 2011).

L'interaction LRRK2/tubuline est associée à une modulation de la stabilité des microtubules et à leur acétylation (Godena et al., 2014; Law et al., 2014). Cette modulation pourrait être une action directe de LRRK2 sur la tubuline ou bien indirecte via une interaction avec la protéine Tau (microtubule-associated protein tau) car LRRK2 est capable de phosphoryler la protéine Tau (Bailey et al., 2013; Kawakami et al., 2012).

Parallèlement au rôle de LRRK2 sur les microtubules, LRRK2 est capable de moduler le désassemblage du cytosquelette d'actine (Caesar et al., 2015).

Pour finir, l'une des cibles de LRRK2 la plus connue est la protéine Moesine (Jaleel et al., 2007; Parisiadou et al., 2009). Cette protéine fait partie du complexe ezrine/radixine/moesine (ERM) et intervient dans la régulation de l'actine et dans la structure des filaments d'actine, notamment au niveau de l'accrochage des filaments d'actine à la membrane plasmique (Mangeat et al., 1999).

3.4.2 AUTOPHAGIE/ENDOCYTOSE

In vitro et *in vivo*, la surexpression de formes mutées de LRRK2 ou l'inactivation (« knockdown ») de LRRK2 induit des changements mesurables des processus autophagiques. Son rôle précis n'est pas décrit mais plusieurs études suggèrent que LRRK2, via sa localisation et ses partenaires, induirait des altérations dans les voies de l'endocytose, et serait donc responsable d'une dérégulation générale de l'autophagie. *In vitro*, LRRK2 co-localise partiellement avec deux protéines clés de l'autophagie qui sont P62 et LC3 au niveau des vacuoles autophagiques (Alegre-Abarrategui et al., 2009). *In vivo*, LRRK2 co-localise avec les vésicules lysosomales et endosomales (Biskup et al., 2006). LRRK2 interagit avec plusieurs protéines régulatrices de l'autophagie comme les MAPKs qui régulent positivement l'autophagie, Rab7 et Rab5b, des protéines liant le GTP impliquées dans le transport des endosomes tardifs et précoces, la biogenèse lysosomale et la fusion autophagosome-lysosome (Gloeckner et al., 2009; Kuwahara et al., 2016; Shin et al., 2008). Rab7 est montrée comme étant la protéine qui dirige la maturation des autophagosomes/endosomes en induisant leur localisation péri-nucléaire via leur transport le long des faisceaux microtubulaires (Cardoso and Esteves, 2015). L'interaction de LRRK2 et Rab7, et notamment LRRK2 muté G2019S, régulerait négativement Rab7 dans le but de disperser dans le cytosol les lysosomes, afin de rendre inefficace la fusion lysosome/autophagosome. LRRK2 aurait

donc un rôle dans la distribution des lysosomes (Cardoso and Esteves, 2015). LRRK2 mutée induirait une diminution de l'activité de Rab7, entraînant une altération du trafic dans les stades tardifs de l'endocytose (Gómez-Suaga et al., 2014). LRRK2 semble aussi phosphoryler très efficacement les protéines Rab1b, Rab8a et Rab10 qui sont impliqués dans le transport des vésicules à la membrane plasmique (Roosen and Cookson, 2016; Steger et al. 2016).

3.4.3 INFLAMMATION

L'inflammation est un processus associé aux maladies neurodégénératives et notamment la MP (Tansey and Goldberg, 2010). Les études GWAS suggèrent que LRRK2 serait impliqué dans la maladie de Crohn, maladie qui provoque une inflammation et une irritation d'une partie de l'appareil digestif (Barrett et al., 2008). Ces observations renforcent l'hypothèse d'un rôle de LRRK2 dans les processus inflammatoires. Le lien entre LRRK2 et l'inflammation est renforcé par l'observation qu'en périphérie LRRK2 est très exprimé dans les macrophages et les monocytes (Thévenet et al., 2011). Dans le système nerveux central, LRRK2 n'est pas exprimé uniquement par les neurones mais aussi par les astrocytes et les cellules microgliales (Moehle et al., 2012). Son implication précise n'est pas bien caractérisée mais de récentes études ont montré que l'inhibition de l'activité kinase ou le knockdown de LRRK2 atténue la cascade inflammatoire *in vitro* mais aussi *in vivo* (Kim et al., 2012a; Ma et al., 2016; Puccini et al., 2015; Russo et al., 2015). Dans un système artificiel d'activation des microglies en culture par le lipopolysaccharide (LPS), qui permet aux cellules microgliales de passer d'un état quiescent à un état activé de phagocytose, l'inhibition pharmacologique de LRRK2 ainsi que l'utilisation de shRNA ciblant LRRK2 empêchent l'activation des microglies (Moehle et al., 2012). *In vivo*, les rats KO pour LRRK2 sont protégés contre la neurodégénérescence induite par l'injection de LPS (Daher et al., 2014). LRRK2 est étroitement liée à des protéines connues des processus de neuroinflammation comme le facteur de transcription NF-KB ou encore NFAT. NF-KB est un facteur de transcription qui régule l'expression de cytokines pro-inflammatoires incluant TNF α , IL-6 et IL-12. C'est une voie médiée par les TLR. *In vitro*, l'activation du TLR induit la phosphorylation de LRRK2 en position S910 et S935 par une protéine membre de la famille des I κ B kinase (IKKs) (Dzamko et al., 2012). NFAT est un facteur de transcription permettant la transcription d'interleukines. LRRK2 participe à la séquestration de NFAT dans le cytoplasme empêchant son transport au noyau et donc la transcription de gènes cibles. Cet effet sur une voie

indépendante des TLR, suggère que LRRK2 agirait en parallèle sur deux voies indépendantes de la réponse immunitaire.

3.4.4 MITOCHONDRIE

LRRK2 co-localise avec la membrane externe de la mitochondrie dans les neurones de la substance noire de rat. Ainsi, LRRK2 pourrait réguler des fonctions mitochondriales (Biskup et al., 2006). L'altération des fonctions mitochondriales jouerait un rôle essentiel dans les processus de vieillissement mais aussi dans les maladies neurodégénératives (Bose and Beal, 2016). L'un des phénomènes le plus étudié est la fission-fusion des mitochondries car il reflète l'état apoptotique de la cellule. Ce processus est hautement régulé, notamment par des GTPases ainsi que par des protéines de la famille WD40 dont LRRK2 fait partie (Li and Beal, 2005; Naylor et al., 2006). Le domaine WD40 de la protéine Mdv1 est connu pour réguler la fission mitochondriale via une interaction avec Dnm1 (Dynamin GTPase superfamily). De manière intéressante, LRRK2 interagit avec Dnm1 (Stafa et al., 2014), ainsi qu'avec Drp1 (dynamin-related protein 1). *In vitro*, LRRK2 phosphoryle Drp1. Cette protéine est stimulée lors des événements par de nombreux stimuli et migre à la mitochondrie dans son état phosphorylé, induisant la fission via son activité GTPasique (Santos and Cardoso, 2012). Dans les neurones corticaux en culture, la surexpression de LRRK2 muté G2019S augmente l'activité de Drp1 et induit une fission mitochondriale (Niu et al., 2012; Wang et al., 2012a). Contrastant avec ces observations, l'étude de la morphologie des mitochondries sur des biopsies de peaux de patients mutés G2019S a montré une élongation des mitochondries ainsi qu'une augmentation de leur connectivité. Dans ce modèle, l'étude des fonctions mitochondriales a révélé une réduction des niveaux intracellulaires d'ATP, ainsi qu'une réduction du potentiel mitochondrial (Mortiboys et al., 2010). L'état des mitochondries semble aussi impacté dans les cellules souches pluripotentes dérivées de fibroblastes de patients LRRK2 G2019S (Cooper et al., 2012) avec une diminution de la respiration mitochondriale, une augmentation de la fuite des protons ainsi qu'une réduction du mouvement des mitochondries. L'implication directe de LRRK2 dans ces phénomènes n'est pas démontrée.

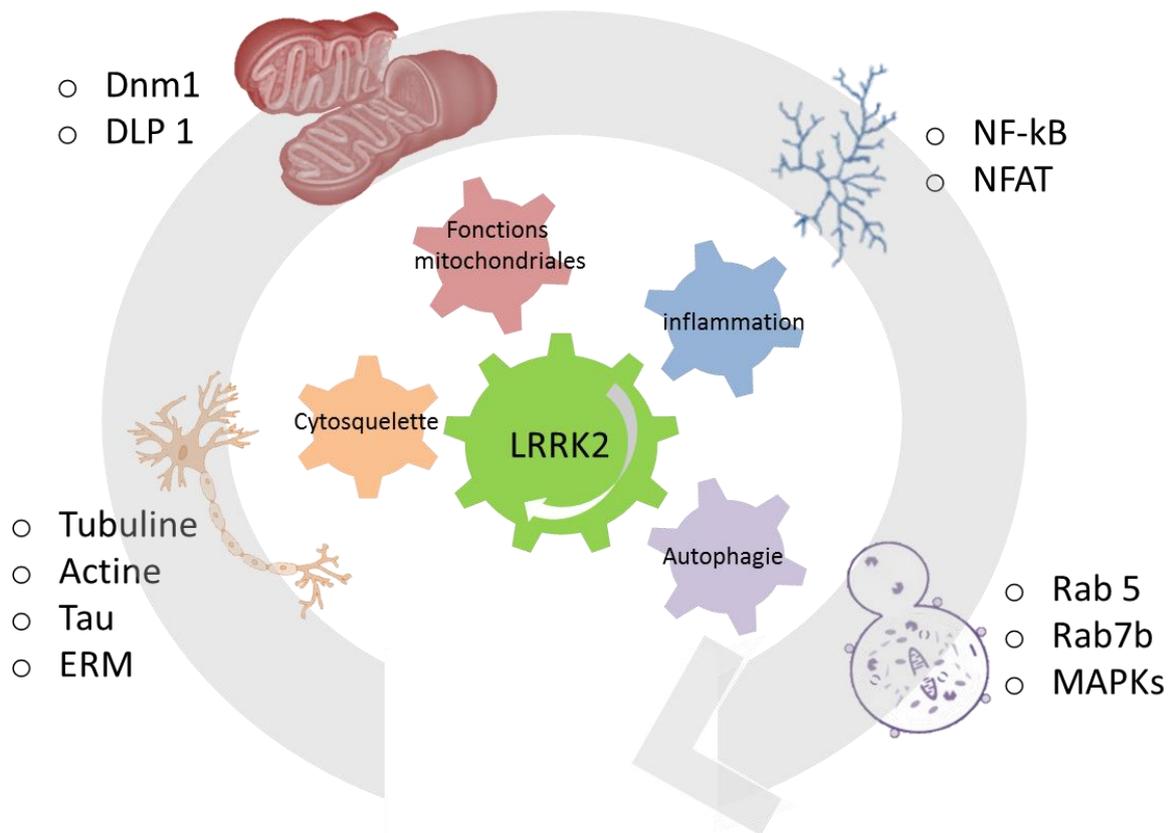


Figure 19: Fonction physiologique de LRRK2 et ses potentiels interacteurs.

Les fonctions physiologiques de LRRK2 sont variées. Il est suggéré que LRRK2 (1) aurait un rôle dans la dynamique du cytosquelette interagissant avec des protéines comme la tubuline, l'actine, tau ou encore les protéines Erzin-Moesin-Radixin. (2) Via ses interacteurs Dnm1 et DLP1 aurait des fonctions mitochondriales, (3) régulerait des processus de neuroinflammation et (4) participerait via son action sur des protéines comme les Rabs à la régulation de l'autophagie. Adapté de (Atashrazm and Dzamko, 2016) et de (Wallings et al., 2015).

4 MODELISATION EXPERIMENTALE DE LA MP CHEZ LE RONGEUR ET LE PRIMATE NON-HUMAIN

Le mécanisme d'action des toxines et des pesticides est décrit dans la **Figure 20**.

4.1 LES TOXINES

4.1.1 6-OHDA

La 6-Hydroxydopamine est un composé dont la structure est similaire à la dopamine. Sa toxicité sélective pour les neurones monoaminergiques passe, tout comme le MPP+, par les transporteurs dopaminergiques et noradrénergiques (NETs) (Luthman et al., 1989). L'injection de 6-OHDA dans la SNc et dans le faisceau antérieur médian induit une dénervation striatale importante ainsi qu'à une perte massive des neurones DA. Chez le primate, la sévérité de la lésion induite par l'injection de 6-OHDA dépend de la dose injectée ainsi que la structure ciblée (SN, striatum, faisceau antérieur médian) (Emborg, 2004). Selon la dose utilisée, les symptômes moteurs mesurables sont transitoires et ne perdurent pas dans le temps (Emborg, 2007). Chez les rongeurs, l'injection de 6-OHDA induit une dégénérescence plus ou moins rapide en fonction de la région ciblée. L'injection dans la substance noire induit une dégénérescence en 2 à 3 jours, l'injection dans le striatum induit une dégénérescence rétrograde de la SN en 3 semaines. Les altérations motrices étant très marquées lors d'une injection unilatérale de cette toxine dans le cerveau, il est possible de détecter des atteintes motrices. La stimulation du système DA via l'utilisation d'agonistes des récepteurs DA (apomorphine), ou via des composés induisant la libération de DA (amphétamine) induit un comportement rotatoire dont l'amplitude est corrélée à la sévérité de la lésion (Tieu, 2011).

4.1.2 MPTP

L'existence d'un lien entre une toxine environnementale et le risque de développer une MP a largement été renforcée par les observations du Dr. Langston. En 1982, ce neurologue constate la survenue de sept cas de syndrome parkinsonien répondeurs à la Levo-dopa (Ballard et al., 1985; Langston et al., 1983) dans le comté de Santa Clara en Californie chez de jeunes sujets consommant de l'héroïne contaminé par du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-

tétrahydropyridine) . A la suite de cette observation, Langston et collaborateurs ont montré que l'injection systémique de MPTP chez le primate induit une dégénérescence sélective de la SNc (Langston et al., 1984). En 1995, dans un livre nommé « The case of the Frozen Addicts » récemment réédité, les docteurs William Langston et Jon Palfreman ont publié leurs recherches. Grâce à sa spécificité d'atteinte de la SNc, le MPTP devint très vite un outil de choix pour modéliser chez la souris ou le primate non-humain (PNH) la dégénérescence de la SNc, le rat étant quant à lui très peu sensible au MPTP (Giovanni et al., 1994). Le MPTP est une molécule qui traverse facilement la barrière hémato-encéphalique (BHE) de par sa composition lipophile. Le MPTP n'est pas toxique en lui-même. C'est en fait sa conversion en MPP+ (1-méthyl 4-phenylpyridinium) par les cellules astrocytaires ainsi que par les cellules sérotoninergiques par la MAO-B qui est toxique (Chiba et al., 1984). Le MPP+ induit sélectivement une mort rapide des neurones DA de la SN via son affinité importante avec le transporteur à la dopamine, DAT (Bezard et al., 1999). A l'heure actuelle, l'injection de MPTP chez le PNH est la stratégie de référence pour tester de nouvelles thérapies pour la MP, les animaux présentant des signes moteurs très similaires à ceux observés chez les patients atteints de la MP (Porras et al., 2012).

Ces modèles utilisant des toxines, en particulier le MPTP et la 6-OHDA ne reproduisent pas tous les symptômes de la MP mais induisent une pathologie similaire à la MP, avec une dégénérescence très rapide du système dopaminergique contrairement à la MP où la dégénérescence est progressive. Une autre signature histopathologique de la MP est la présence de corps de Lewy. Dans ces modèles d'intoxication, les CL ne sont pas présents. Néanmoins, ces modèles ont permis, bien avant l'arrivée des modèles transgéniques, de mieux comprendre certains aspects clé de la physiopathologie de la MP et de développer les approches thérapeutiques nouvelles, dont certaines sont appliquées maintenant en clinique, notamment la stimulation du NST à haute fréquence (Bezard et al., 2013).

4.2 PESTICIDES

4.2.1 ROTENONE

La roténone est un flavonoïde trouvé naturellement dans les plantes tropicales. Elle entre dans la composition de nombreux pesticides et insecticides. Cette substance a été interdite à la suite d'examens effectués par la Commission européenne. Un arrêté du 10 avril 2008

demande à tous les Etats membres de retirer les autorisations des produits contenant de la roténone, classifiant ce produit comme toxique dont l'utilisation est à risque. Sa toxicité provient de son effet inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, elle entraîne la baisse de synthèse de l'ATP, la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'une inhibition de l'activité du protéasome. L'utilisation en recherche de la roténone induit, chez le rat, une dégénérescence nigrale ainsi que des inclusions positives pour l'ubiquitine et l' α -synucleine associée à une hypokinésie et une rigidité des animaux (Betarbet et al., 2000). Néanmoins, la spécificité de la roténone pour la SNc est difficile à maîtriser. Cela conduit souvent à des lésions striatales (Höglinger et al., 2003).

4.2.2 PARAQUAT

Le paraquat appartient à la famille chimique des pyridines. C'est l'herbicide le plus utilisé en agriculture. Les premières études chez le rat concernant la toxicité du paraquat remontent aux années 1970. Kimbrought et Gaines ont étudié les effets du paraquat sur les poumons après son administration par voie orale. Ils ont mis en évidence des altérations pulmonaires (Kimbrough and Gaines, 1970). L'injection périphérique de paraquat chez le rat devient un modèle d'étude de lésion pulmonaire. Dans les années 90, il est montré que le paraquat ferait partie des facteurs environnementaux augmentant le risque de développer la MP (Hertzman et al., 1990; Liou et al., 1997). Les études chez le rat et la souris montrent une dégénérescence nigrale après injection de paraquat ainsi qu'une accumulation d' α -synucleine (Manning-Bog et al., 2002; Thiruchelvam et al., 2000). Son mécanisme met en jeu une augmentation du stress oxydant, comme la roténone, sans être un inhibiteur direct de la chaîne respiratoire.

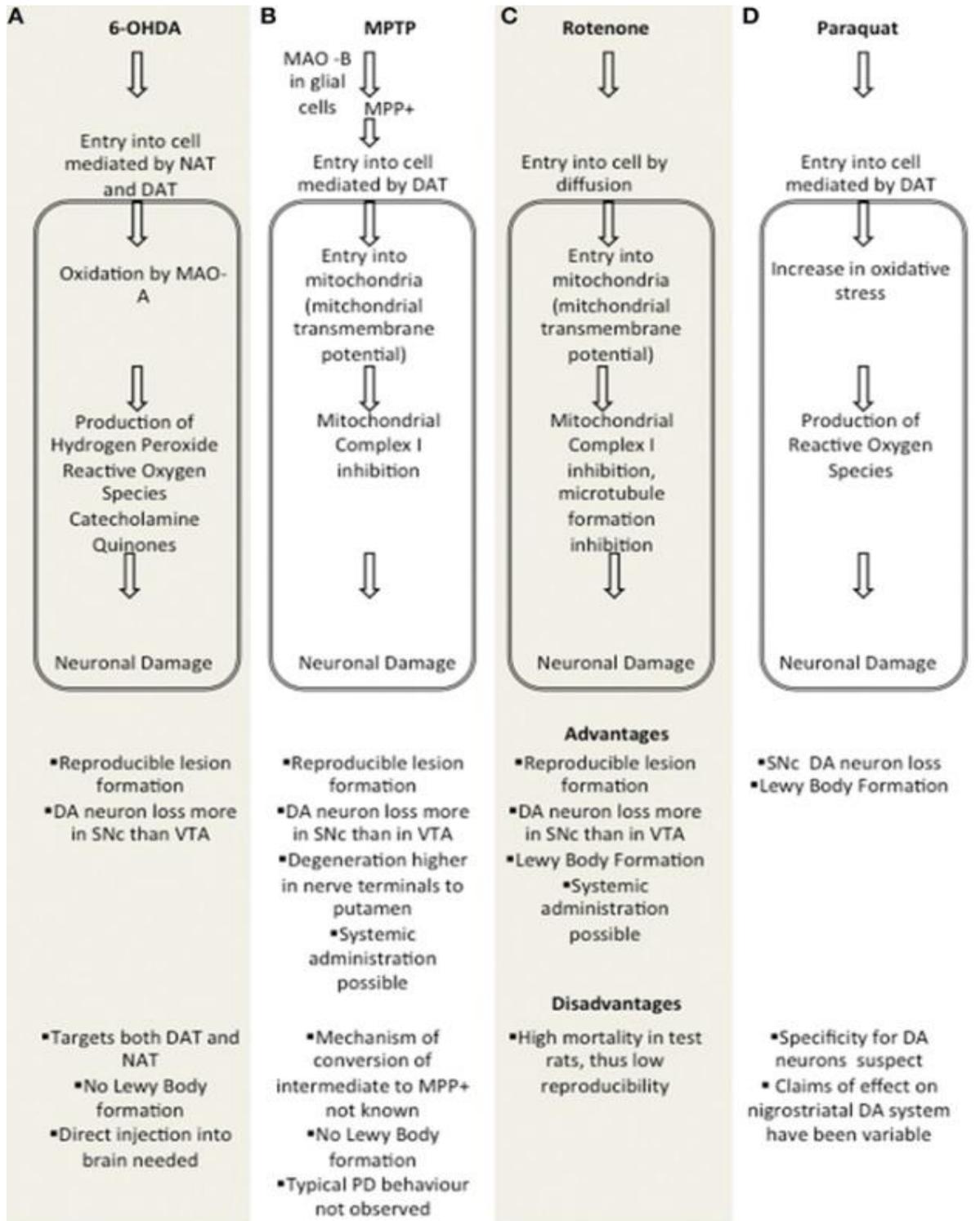


Figure 20: Mécanisme d'action des toxines et des pesticides.

(Jagmag et al., 2016).

4.3 INJECTION DE FIBRILLES DE SYNUCLEINE

Comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe 2.2.2.3, l' α -synucléine mal conformée aurait la capacité de passer de cellule en cellule, propageant ainsi sa conformation pathologique aux protéines α -synucléine endogènes correctement conformées. Nous avons vu que le passage de l'état de monomères à la formation d'une fibrille de type amyloïde nécessite différentes étapes pour *in fine* conduire à la formation d'un CL. Expérimentalement, l'inoculation chez de jeunes souris TgM83+/, (souris TgM83+/, souris transgéniques exprimant l' α -synucléine humaine muté A53T, décrites dans la partie 4.4.1) d'homogénats de cerveaux de souris TgM83+/+ âgées induit une réduction de la survie des animaux après 130 jours d'incubation (Luk et al., 2012b, 2012a; Mougenot et al., 2012). De manière similaire, l'inoculation striatal de CLs purifiés à partir d'homogénats de patients atteints de la MP induit, chez la souris et le primate, une pathologie ressemblant à une synucléinopathie à distance du site d'injection, ainsi qu'une dégénérescence des neurones de la voie nigro-striée (Recasens et al., 2014). Ces études montrent qu'il est possible d'induire une synucléinopathie chez des animaux sains après l'inoculation d'homogénats de cerveaux contenant des formes pathologiques de l' α -synucléine. En revanche, il n'est pas exclu que les autres composants présents dans les agrégats d' α -synucléine contribuent, eux aussi, aux effets observés. Pour étudier spécifiquement le rôle de l' α -synucléine et surtout des fibrilles, la production *in vitro* de fibrilles de synucléine est une alternative particulièrement intéressante. L'injection de fibrilles générées *in vitro* d' α -synucléine, chez le rat, la souris ainsi que chez le marmoset sains, induit une pathologie synucléine dans les régions anatomiquement connectées au site d'injection, induisant une mort progressive des neurones de la SNc (Luk et al., 2012a; Paumier et al., 2015; Peelaerts et al., 2015; Shimosawa et al., 2017). Les espèces d' α -syn oligomériques (mais non fibrillaires) semblent pouvoir se propager rapidement dans le cerveau. Notamment la propagation/dispersion depuis le bulbe olfactif est extrêmement rapide (Rey et al., 2013).

4.4 LES MODELES TRANSGENIQUES

Les modèles transgéniques, qu'ils soient générés chez *C.elegans*, la drosophile, la souris ou le rat, sont des outils de choix dans la compréhension des mécanismes pathogéniques mis en cause dans la MP. Plusieurs considérations sont à prendre en compte dans le développement d'un modèle génétique de maladie, notamment la reproduction, partielle ou complète, des phénotypes observables dans la pathologie. Le choix de la forme humaine ou murine du transgène est également un paramètre à prendre en compte. En effet, les souris exprimant la forme humaine de l' α -synucléine développent certains aspects de la pathologie, alors que les souris surexprimant la forme murine ne développent pas de phénotypes neurodégénératifs au même âge (Chandra et al., 2005). Dans cette partie, seuls les modèles transgéniques générés chez la souris et le rat seront présentés.

4.4.1 MODELES TRANSGENIQUES DE SYNUCLEOPATHIE A53T

La découverte de mutations du gène codant pour l' α -synucléine dans certaines formes de MP familiale, a permis le développement de modèles murins mimant certains aspects de la pathologie. La mutation A53T est, de loin, la plus étudiée. De manière surprenante, la forme murine endogène de l' α -synucléine à la position 53 de la séquence en acides-aminés est une thréonine (53T). Chez l'homme, le remplacement de l'alanine par une thréonine en position 53 (A53T) est pathologique (Xu et al., 2012).

Depuis les années 2000, plusieurs souris transgéniques sur-exprimant l' α -synucléine humaine mutée A53T ont été produites. Un récapitulatif est présenté dans la **Table 4**. Plusieurs revues ont réalisé des comparaisons très précises entre ces modèles (Chesselet and Richter, 2011; Dawson et al., 2010). Les niveaux d'expression de l' α -synucléine et les phénotypes mesurés dans ces modèles dépendent du promoteur utilisé (Chesselet and Richter, 2011).

Pour une expression majoritairement neuronale, les promoteurs Thy1, PDGF et Prp sont couramment utilisés et permettent une expression dans plusieurs régions du cerveau notamment, corticale. Cependant, dans la SNc, les transgènes ne s'expriment que très peu, pour des raisons qui ne sont pas encore établies (Giasson et al., 2002; Gispert et al., 2003; Masliah et al., 2000; Putten et al., 2000).

Ces souris ne présentent pas tous les aspects de la pathologie humaine. On note notamment, l'absence de l'agrégation de l' α -synucléine, de la mort progressive des neurones dopaminergiques ainsi que de la dégénérescence des fibres nigro-striatales. Certaines souris développent des agrégats d' α -synucléine mais ne présentent pas de mort neuronale, alors que d'autres montrent une perte cellulaire sans agrégation d' α -synucléine. Les altérations motrices dans ces modèles ne semblent pas corrélées avec l'agrégation ou la mort neuronale. Par exemple, les souris Thy1- α -synucléine A53T développent des déficits moteurs dans le test du rotarod, une accumulation d' α -synucléine, une dénervation des muscles mais aucune perte cellulaire n'a été reportée dans la SNc certainement liée à la non-expression de l' α -synucléine dans cette région (Putten et al., 2000). Lee et collaborateurs ont généré des souris transgéniques exprimant l' α -synucléine humaine sous promoteur Prp. Ces souris développent des altérations mitochondriales, une perte neuronale dans le néocortex et dans le tronc cérébral, sans présenter de dégénérescence de la SNc (souris TgM83) (Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002; Martin et al., 2006). Les atteintes motrices observées résulteraient d'une dégénérescence des neurones moteurs dans la moelle épinière (Martin et al., 2006). L'utilisation du promoteur TH permet l'expression spécifique de l' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques de la substance noire. Les études ont montré que ces souris ne présentent pas de perte neuronale dans la SNc (Maskri et al., 2005; Matsuoka et al., 2001). Pour pallier au fait que, dans ces modèles, l' α -synucléine ne s'exprime pas selon le patron d'expression de l' α -synucléine endogène, une autre approche a été utilisée. Des souris surexprimant l' α -synucléine humaine sous contrôle de son propre promoteur ont été générées via l'utilisation du système PAC (P1-derived artificial chromosome) (Gispert et al., 2003; Kuo et al., 2010). Ces souris présentent des agrégats d' α -synucléine et une réduction de l'activité motrice, sans pour autant induire une dégénérescence de la SNc.

Références	Mutation	Promoteur	Age	Mort Neuronale SNC	Dégénérescence fibres DA	Inclusions dans SN	Altérations motrice
(Giasson et al., 2002)	A53T	Mouse prion	8 m	non	non	oui	modérée
(Gispert et al., 2003)	A53T	Mouse prion	7 m	non	augmentation	oui	modérée
(Putten et al., 2000)	A53T	Mouse Thy-1	12 m	non	non	non	-
(Ono et al., 2009)		Human Thy-1		-	modérée	modérée	modérée
(Lee et al., 2002; Unger et al., 2006)		Mouse Prion		non	non	non	modérée
	A53T	Hamster prion		non			
		PDGF-β		non	OUI		
(Richfield et al., 2002)		Rat TH		oui	modérée	oui	oui
		Thy-1		non			
		Murine Thy-1		NON	OUI		
(Lin et al., 2012)		Pitx3		oui		non	oui
(Kuo et al., 2010)		A-syn (PAC)		non	non	non	modérée

Table 4: Récapitulatif des modèles transgéniques de Synucléopathie (A53T) (Blesa and Przedborski, 2014; Blesa et al., 2012)/ (Chesselet and Richter, 2011)

4.4.2 LES MODELES GENETIQUES LRRK2

Depuis 2010, plusieurs souris et rats génétiquement modifiés sur-exprimant des formes mutées de LRRK2 notamment la forme portant la substitution G2019S (KI (Knock-in), Bacterial artificial chromosome (BAC)) ont été produits. Une souris où le gène codant LRRK2 invalidé, a également été produite (Tong et al., 2010). Un récapitulatif est présenté dans la **Table 5** pour les modèles d'expression de LRRK2 ayant la mutation G2019S. Comme pour les modèles rongeurs α -synucléine, les paramètres mesurés sont la mort neuronale, le taux de DA dans le striatum, la présence d'agrégats de synucléine, ainsi que la présence d'un

phénotype moteur mesurable. La plupart des animaux transgéniques exprimant LRRK2 muté G2019S ne présentent que très peu de dégénérescence neuronale, même à des âges avancés. Ceci est peut-être à mettre en relation avec le fait que, chez l'Homme, la pénétrance de la mutation n'est pas complète. La toxicité de LRRK2 muté G2019S requiert possiblement un contexte cellulaire particulier favorisé par le vieillissement cérébral. Seules les études utilisant le système BAC rapportent une perte neuronale dans la substance noire de l'ordre de 30% entre 8 et 12 mois chez la souris. Chez le rat et la souris, où la forme humaine de LRRK2^{G2019S} est exprimée via un chromosome bactérien artificiel, certaines atteintes motrices, associées à une dysfonction du système dopaminergique ont été rapportées (Li et al., 2010; Sloan et al., 2016). En revanche, aucune des études n'a pu mettre en évidence la présence d'agrégats de synucléine ou une importante perte des neurones DA de la SNc à l'exception de l'étude de Xiong et collaborateurs qui montrent une augmentation par westernblot de la forme P- α -synS129 dans le cortex des souris transgéniques exprimant LRRK2 muté G2019S.

Références	Espèce	Technologie	Promoteur	Taux de dopamine	de Mort neuronale SNc	Age	Agrégats α -syn	Phénotype moteur
(Li et al., 2010)	souris	BAC G2019S (murin)		-25%	non	12 m	-	non
(Melrose et al., 2010)	souris	BAC G2019S (humain)		-33%	non	8 m	non	non
(Winner et al., 2011a)	souris	BAC G2019S (humain)		diminution	non	10 m	-	
(Ramonet et al., 2011)	souris	KI	CMVE-PDGF β	inchangée	-18 %	20 m	-	non
(Chen et al., 2012)	souris	KI	CMVE-PDGF β	diminution	-30 %	12 m		oui
(Yue et al., 2015)	souris	KI		inchangée	non	20 m	-	non
(Garcia-Miralles et al., 2015)	souris	KI			non	13 m	non	non
(Zhou et al., 2009)	souris	transgénique	inductible	Non	non			modérée

(Walker et al., 2014)	Rat	BAC G2019S		non	non	6 m	-	modérée
(Lee et al., 2015)	Rat	BAC G2019S		non	non	12m	-	modérée
(Xiong et al., 2017)	souris	transgénique	inductible	-	-	22m	+	modéré

Table 5: Récapitulatif des modèles transgéniques LRRK2 G2019S

4.5 LES MODELES VIA L'UTILISATION DE VECTEURS VIRAUX

4.5.1 GENERALITES SUR LES VECTEURS VIRAUX

Les vecteurs viraux, dérivés de virus sauvages, utilisent la capacité à introduire leur matériel génétique dans la cellule et conservent leur capacité à passer les barrières cellulaires (membranes plasmique et nucléaire) avec une grande efficacité. Néanmoins, une différence essentielle existe entre les virus et les vecteurs viraux : les vecteurs viraux sont rendus inoffensifs par la délétion des gènes pathogéniques ainsi que par la suppression des gènes codant pour les protéines virales. La suppression d'une large partie des gènes viraux permet de cloner un gène d'intérêt. Il peut s'agir : d'un gène thérapeutique, d'un shARN ou d'un gène mutant, dans le cas du développement de modèles pathologiques. Quatre principaux types de vecteurs viraux sont actuellement utilisés pour le SNC : les vecteurs dérivés de l'herpès simplex virus de type 1 (HSV-1), des adénovirus (Ad), des virus associés aux adénovirus (AAV, *adeno-associated virus*) ou des rétrovirus parmi lesquels les lentivirus (LV). Les principales caractéristiques de ces vecteurs viraux sont résumées dans la **Table 6**.

Le choix du vecteur se fait selon : 1) sa capacité de clonage, 2) sa capacité à transduire efficacement les différents types cellulaires du SNC, 3) la durée d'expression du transgène, 4) la possibilité de le produire efficacement avec un titre élevé, 5) sa cytotoxicité et 6) son immunogénicité. Pour le SNC, les vecteurs dérivés des LV et des AAV sont les vecteurs de choix, du fait qu'ils peuvent transduire tous les types cellulaires, qu'ils induisent une expression sur le long terme, que leur production en laboratoire est maîtrisée, et enfin qu'ils sont faiblement pathogéniques et immunogéniques. Bien que moins efficaces que les LV et les AAV, les vecteurs dérivés des HSV et des Ad se montrent également utiles pour le transfert de gène dans le SNC.

4.5.1.1 VIRUS ADENO-ASSOCIES (AAV)

Les vecteurs AAV sont capables de transduire efficacement différents types de tissus, cellules musculaires, cardiaques, rétine ainsi que les cellules du cerveau (Chu et al., 2004; Hellström et al., 2008; Tenenbaum et al., 2004). Leur capacité de clonage est de l'ordre de 4.5-5 kb (Baekelandt et al., 2000). Ce sont des vecteurs non intégratifs, c'est-à-dire que le transgène ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte limitant des insertions non souhaitables. Le vecteur le plus utilisé pour infecter les neurones est le sérotype 2 (AAV2) (Passini et al., 2004). Ce sérotype est montré comme étant majoritairement neuronal, mais d'autres types de cellules du SNC peuvent aussi être transduits, comme les astrocytes. La modification de la capsid de l'AAV permet de déterminer plus précisément le tropisme cellulaire. Ainsi, de nombreux AAV2/X ont été générés ciblant grâce à leur capsid telle ou telle cellules (neurones, astrocytes,...).

4.5.1.2 LENTIVIRUS

Un des avantages des LV est leur large capacité de clonage. En effet, le génome d'un lentivirus sauvage mesure environ 10 kb et la délétion des gènes pathogéniques permet de cloner un fragment jusqu'à environ 8 kb. Il a même été montré qu'un fragment ayant jusqu'à 18 kb peut être inséré et enveloppé dans le LV final. Mais plus la taille du fragment est large, plus le titre viral est diminué (Kumar et al., 2001). De plus, le génome viral des LV est intégré au génome de la cellule hôte, permettant une expression stable sur le long terme. Toutefois, ce point s'avère être aussi l'origine de la limite majeure à l'utilisation des vecteurs lentiviraux en thérapie génique, l'intégration aléatoire dans le génome de la cellule cible pouvant entraîner des risques de mutagenèse insertionnelle (Bokhoven et al., 2009; Hargrove et al., 2008).

4.5.1.3 HSV

Les vecteurs dérivés du virus de l'Herpès possèdent une capacité de clonage d'ADN double brin de 50 à 150 kb. Ceci permet de cloner la plupart des transgènes, ceux de grande taille notamment. Dans le SNC, le HSV-1 a, naturellement, un fort neurotropisme qui est conservé par les vecteurs qui en dérivent (Tabbaa et al., 2000). Le ciblage spécifique de sous- types neuronaux peut être obtenu par l'utilisation de promoteurs spécifiques (Cao et al., 2008;

Song et al., 1997; Wang et al., 2004). Dans le striatum, l'expression du transgène peut être observée jusqu'à 6 mois post-transduction (Zhang et al., 2000).

4.5.1.4 ADENOVIRUS (ADV)

Les vecteurs dérivés des adénovirus sont des vecteur à ADN double brin ayant une capacité maximale de clonage d'environ 30 kb (Howarth et al., 2010). Les Adv les plus utilisés sont les Adv 2 et 5, car ils permettent la transduction de différents types de tissus, cellules musculaires, cardiaques, et cellules nerveuses. L'induction d'une réponse immunitaire forte après leur injection dans le cerveau est leur principale limitation.

Les vecteurs adénoviraux sont capables de transduire aussi bien les neurones que les cellules gliales (Le Gal La Salle et al., 1993). Afin d'exprimer sélectivement un transgène dans les neurones ou les astrocytes, il est possible d'utiliser des promoteurs cellule-spécifiques (Bhattacharjee et al., 2004; Kügler et al., 2001; Vandier et al., 2000).

	Lentivirus	Adénovirus	Virus Adéno-associé	Herpès simplex virus
Génome	Ss ARN	Ds ADN	Ss ADN	Ds ADN
Enveloppe	oui	non	non	oui
Capacité de clonage max (kb)	7-7.5	30	4.5-5	50-150
Intégration génome hôte	oui	non	Oui/non	non
Début d'expression <i>in vivo</i>	24H à 1 semaine	1 semaine	1-2 semaines	1-2 jours
Stabilité de l'expression	+	-	+	++
Réponse immunitaire	-	++	+/-	+/-
Titre (particules viral/ml)	10 ⁸	10 ¹²	10 ¹²	10 ¹²

Table 6: Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gène dans le SNC, sb : simple brin ; Ds : double brin. Adapté de (Papale et al., 2009; Van der Perren et al., 2015a)

4.5.2 MODELES VIRAUX EXPRIMANT LA SYNUCLEINE

A la différence des modèles induits par transgénèse, les modèles générés via l'utilisation de vecteurs viraux permettent d'induire la dégénérescence nigro-striatale rapide, ainsi que,

pour certains modèles la formation d'agrégats d' α -synucléine de type corps de Lewy et un phénotype moteur détectable. La surexpression, via les vecteurs viraux de l' α -synucléine spécifiquement dans la SNc de souris, rats ou encore primates non-humain, est une approche qui présente de nombreux avantages, notamment en terme de coût et de temps de développement, comparé aux modèles transgéniques qui sont principalement limités aux rongeurs. Pour des soucis de simplification et pour rester dans le cadre des résultats présentés plus loin, il ne sera présenté, dans la table récapitulative que les résultats obtenus chez le rat après injection de la forme mutée A53T (même si une approche similaire a été utilisée également chez la souris et le PNH (Vermilyea and Emborg, 2015)). La perte neuronale dans la substance noire semble varier en fonction du type de vecteur (en particulier du sérotype d'AAV), du promoteur ainsi que le nombre de particules virales utilisé pour induire l'expression de l' α -synucléine (Van der Perren et al., 2011). Des données plus récentes montrent également que le type d' α -synucléine (sauvage ou mutée ; souris, rat ou humaine) détermine l'amplitude de la neurodégénérescence et la vitesse avec laquelle elle s'instaure (Volpicelli-Daley et al., 2016a) (**Table 7**).

Références	Vecteur	Promoteur	Titre	Espèce	SNc	Age	Agrégats α -syn	Phénotype moteur
(Kirik et al., 2002)	rAAV2/2	CBA	1.5x10 ⁹	Rat	30-80%	8-16 s	oui	modéré
(Lo Bianco et al., 2002)	LV	PGK	6x10 ⁵	Rat	24-35%	20 s	oui	-
(Maingay et al., 2006)	rAAV2/2	CBA	-	Rat	40%	14 s	-	-
(Chung et al., 2009)	rAAV2/2	Syn-1	-	Rat	35%	17 s	-	-
(Koprach et al., 2010)	rAAV1/2	CBA	5X10 ¹²	Rat	28%	6 s	oui	modéré
(Winner et al., 2011b)	LV	CMV	3x10 ⁵	Rat	17-40%	3 s	-	-
(Van der Perren et al., 2015b)	rAAV2/7	CMV/Syn-1	-	Rat	80-90%	4 s	oui	+

Table 7: Récapitulatif des modèles générés via l'utilisation de vecteurs viraux codant pour l' α -synucléine mutée A53T chez le rat

4.5.3 MODELES VIRAUX EXPRIMANT LRRK2

La taille du cDNA codant pour la protéine LRRK2 (7581 paires de bases) empêche totalement son insertion dans un vecteur AAV. En effet, ce dernier, a une capacité de clonage limitée à 5 Kb. La taille du cDNA de LRRK2 approchant la capacité de clonage du lentivirus, les titres obtenus sont si faibles que leur utilisation *in vivo* est très inefficace. Néanmoins, l'utilisation de ces lentivirus codant pour LRRK2 *in vitro* semble être efficace (Civiero et al., 2012). Contrairement à l' α -synucléine, l'utilisation de vecteurs viraux à haute capacité de clonage est essentielle dans le cas de LRRK2. Jusqu'à aujourd'hui, seul deux équipes ont générés un modèle LRRK2 utilisant des vecteurs HSV et adénoviraux (Dusonchet et al., 2011; Lee et al., 2010a). Dans les deux cas, les injections ont été réalisées dans le striatum. Les particules virales sont transportées jusqu'à la substance noire par voie rétrograde. Dans la première étude utilisant des adénovirus, 31 % des neurones dopaminergiques sont transduits et la forme mutée G2019S de LRRK2 induit une perte significative du nombre de neurones, 10 % dès 10 jours et allant jusqu'à 21 % à 42 jours après l'injection dans le striatum chez le rat (Dusonchet et al., 2011). Dans la seconde étude, 75 % des neurones dopaminergiques expriment le transgène et la forme mutée G2019S de LRRK2 induit une perte neuronale de l'ordre de 50 %, 21 jours après l'injection des vecteurs HSV dans le striatum chez la souris (Lee et al., 2010a). Dans les deux cas, la présence d'un phénotype moteur n'est pas évoquée (**Table 8**). Ainsi, si ces approches sont encourageantes, il semble intéressant de considérer la possibilité d'améliorer certains aspects des modèles viraux de surexpression des formes mutées de LRRK2. Notamment, pour s'affranchir du rôle de l'inflammation une expression spécifiquement dans les neurones dopaminergiques.

Références	Vecteur	Promoteur	Espèce	SNC	Age	Agrégats α -syn	Phénotype moteur
(Lee et al., 2010a)	HSV	HSV IE 4/5	Souris	50%	21 jours PI	non	-
(Dusonchet et al., 2011)	Adénovirus	Synapsin-1	Rat	21%	42 jours PI	non	-

Table 8: Récapitulatif des modèles générés via l'utilisation de vecteurs viraux codant pour LRRK2 mutée G2019S chez le rat et la souris.

Contexte et objectifs du travail de thèse

5 CONTEXTE GENERAL ET QUESTIONS POSEES

5.1 CONTEXTE ARTICLE 1

Les mécanismes conduisant à la toxicité de LRRK2 sont inconnus. Néanmoins, il est montré que le domaine kinase et la régulation de l'activité de la kinase jouent un rôle important, notamment lorsque le domaine kinase porte la mutation G2019S. Ce gain toxique de fonction semble être neurotoxique pour la SNc (West et al., 2005). Plusieurs voies pourraient être à l'origine de la mort des neurones dopaminergiques engendrée par LRRK2, comme l'atteinte du cytosquelette, l'autophagie, et le trafic vésiculaire (décrit dans la partie 3.4). La plupart des modèles de souris transgéniques ne présentent pas (ou très peu) de phénotypes pathologiques. Le « meilleur » modèle transgénique décrit jusqu'à présent est caractérisé par un délai très long pour obtenir la mort des neurones (19/20 mois), qui est relativement faible (14%) et l'absence de symptômes moteurs majeurs (Ramonet et al., 2011). Il est, sur le plan pratique, impossible à utiliser pour évaluer de nouvelles approches thérapeutiques visant à ralentir/diminuer la mort des neurones dopaminergiques exprimant LRRK2 mutée (inhibiteurs de la kinase, facteurs neurotrophiques, voies de signalisation spécifiques...).

L'utilisation de vecteurs viraux, permettant la surexpression de LRRK2 mutée dans le cerveau d'animaux adultes, constitue une alternative prometteuse à la transgénèse, car une expression plus forte du transgène induit une neurotoxicité plus rapide et plus sévère. Chez le rat, l'injection, dans le striatum, d'adénovirus à transport rétrograde permettant la surexpression de LRRK2 mutée G2019S dans la SNc, conduit à une neurodégénérescence rapide (21 jours) mais qui reste assez faible (20%) (Dusonchet et al., 2011). Chez la souris, l'infection, dans le striatum, d'un Herpes Simplex Virus (HSV) à transport rétrograde codant pour LRRK2 mutée G2019S, a permis de produire une perte des neurones de la SNc plus importante (environ 50%) et rapide (3 semaines) (Lee et al., 2010). Ce modèle semble très intéressant, mais la production et l'utilisation des HSV restent délicates. De plus, l'inflammation induite par ses vecteurs n'est pas négligeable. Par ailleurs, Le rétro-transport dans la SNc n'étant pas efficace à 100%, ces vecteurs infectent également en même temps

les cellules du striatum (oligodendrocytes, astrocytes, neurones). Il est possible que la dégénérescence observée soit, en partie due au fait de la présence de LRRK2 de part et d'autre de la synapse, auquel s'ajouterait une inflammation due à l'utilisation de ces vecteurs.

Ces modèles très encourageants peuvent être améliorés, notamment en utilisant des vecteurs viraux plus efficaces, plus facilement manipulables, et capables d'infecter une population cellulaire restreinte. Cela permettra d'aborder, par exemple, l'aspect toxique purement neuronal. Le rôle des différents domaines n'a pas été évalué dans ces modèles et notamment, le rôle de la partie C-terminale de LRRK2 portant le domaine kinase.

Ces constats nous ont amené à nous intéresser à une question cruciale :

- ❖ La mutation G2019S de LRRK2 est-elle capable d'induire une toxicité lorsqu'elle est exprimée spécifiquement dans les neurones de la substance noire par un mécanisme cellulaire autonome (« cell-autonomous ») ou nécessiterait-elle l'intervention d'autres types cellulaires (la microglie ou les astrocytes notamment) ?

Ces questions ont été abordées dans le cadre de l'Article 1, présenté dans la suite du document.

5.2 CONTEXTE ARTICLE 2

A ce jour, le rôle d'une interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l' α -synucléine dans la MP demeure indéterminé. Les études de GWAS portant sur l'interaction gène-gène n'ont pas montré d'interaction génétique entre LRRK2 et l' α -synucléine (Biernacka et al., 2011). Néanmoins, l'existence d'une possible interaction entre ces deux protéines a pourtant été très tôt soulevée. Seulement deux années après la découverte de LRRK2 comme étant un gène responsable de formes familiales de la MP, Zimprich et collaborateurs ont montré par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de patients que LRRK2 était présente dans les corps de Lewy, suggérant que LRRK2 et l' α -synucléine pourraient interagir physiquement (Zimprich et al., 2004). Depuis, d'autres équipes ont validé l'existence d'une co-localisation entre LRRK2 et l' α -synucléine dans les corps de Lewy (Alegre-Abarrategui et al., 2008; Miklossy et al., 2006; Perry et al., 2008; Vitte et al., 2010). Plus précisément, LRRK2 co-localiserait préférentiellement avec les dépôts de type granulaire de l' α -synucléine, correspondant à la phase de début d'agrégation, et serait exclue des phases plus avancées d'agrégation (Alegre-Abarrategui et al., 2008). De manière intéressante, la mutation G2019S de LRRK2 augmenterait le recrutement de LRRK2 dans les corps de Lewy au niveau de la SNC. En effet, LRRK2 est retrouvée dans 24 % des corps de Lewy, chez les patients atteints de formes dites sporadiques de la MP. Ce pourcentage s'élève à 50 % des corps de Lewy chez les patients porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 (Vitte et al., 2010).

Toutes ses données, obtenues par l'étude post mortem du tissu cérébral de patients, confortent l'hypothèse que LRRK2 pourrait interagir de manière directe ou indirecte avec l' α -synucléine, et ainsi moduler son état de phosphorylation et donc sa capacité à s'agréger.

Les données expérimentales acquises chez les modèles animaux à ce sujet ne sont pas totalement congruentes (Daher et al., 2012, 2015; Herzig et al., 2012; Lin et al., 2009a; Volpicelli-Daley et al., 2016b). Si les premières études ont montré que LRRK2 (G2019S) favorisait la toxicité de l' α -synucléine (A53T), d'autres travaux montrent peu d'effets modificateurs de LRRK2. Par ailleurs, les modèles animaux, où un effet facilitateur de LRRK2 sur la toxicité de l' α -synucléine a été observé, ne permettent pas de déterminer si cet effet facilitateur résulte de l'interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l' α -synucléine uniquement au sein des neurones ou si d'autres types cellulaires (notamment gliaux) interviennent.

LRRK2 pourrait interagir « directement » ou « indirectement » avec l'α-synucléine. En effet, les deux protéines possèderaient des interacteurs protéiques en commun (Figure 21). Plus généralement, LRRK2 et l'α-synucléine semblent jouer, toutes les deux, un rôle important sur des fonctions communes, en particulier la régulation de la machinerie des vésicules synaptiques. Les formes mutées de ces deux protéines affectent toutes les deux, des systèmes cellulaires en commun, notamment la mitochondrie (Gautier et al., 2014). Par ailleurs, le rôle moléculaire précis du domaine kinase de LRRK2 dans cette interaction reste indéterminé. Les implications thérapeutiques liées à ces questions sont majeures. En effet, les inhibiteurs de LRRK2 pourraient ralentir l'évolution de la MP liée à la mutation de LRRK2. Mais de plus, lorsque LRRK2 n'est pas mutée, ils pourraient ralentir l'évolution de la maladie dans les cas sporadiques de MP.

Toutes ses observations soulèvent des questions fondamentales :

- ❖ Les deux protéines agissent-elles de concert dans le développement de la pathologie ?
- ❖ L'activité kinase de LRRK2 provoque-t-elle un effet facilitateur dans le déclenchement de la pathologie?

Nous avons tenté de répondre à ces deux questions par les études rapportées dans l'Article 2 présenté dans la thèse.

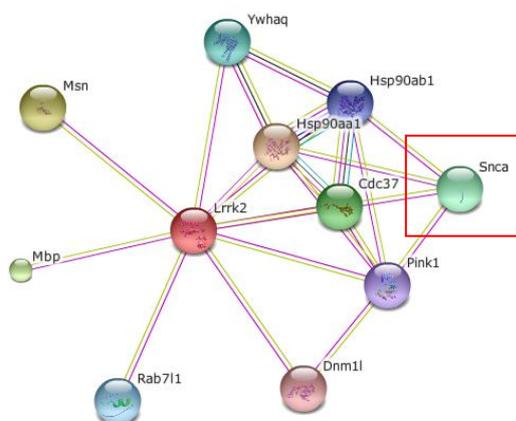


Figure 21: Interactome montrant que LRRK2 interagit indirectement avec l'α-synucléine (SNCA) par l'intermédiaire de partenaires protéiques communs.

L'Interactome de LRRK2 est extrait du site de ressources sur les interactions protéine-protéines (STRING 10.0) <http://stringdb.org>

6 OBJECTIFS ARTICLE 1 ET ARTICLE 2

Objectif article 1 : Dans cette première étude, nous avons eu, pour objectif, de déterminer si la surexpression du domaine C-terminal de LRRK2, portant la mutation G2019S sélectivement dans les neurones de la substance noire, pouvait suffire à produire des effets neurotoxiques et induire la mort des neurones dopaminergiques.

Tout d'abord, nous avons étudié l'impact à long terme (6 mois post-injection) de l'injection stéréotaxique dans la substance noire de rat de deux vecteurs viraux différents, les lentivirus et les AAVs, codant tous deux pour des fragments C-terminaux de LRRK2 sauvage ($\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$) et muté G2019S ($\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$). Le choix des vecteurs utilisés a permis une expression des transgènes spécifiquement neuronale, ce qui nous permettait d'évaluer l'effet de la potentielle toxicité des constructions de LRRK2 uniquement dans les neurones de façon « *cell-autonomous* ».

Publication n°1: *Neuron selective overexpression of the C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation produced neurodegeneration of the substantia nigra. Cresto et al. Soumis*

Objectifs Article 2: Dans ce travail, notre premier objectif a été de déterminer si la surexpression de la partie C-terminal de LRRK2, portant la mutation G2019S, modifiait les effets neurotoxiques de la surexpression de l' α -synucléine (A53T). Nos résultats étant congruents avec cette hypothèse, notre deuxième objectif a été de déterminer si cet effet « *facilitateur* » de LRRK2 vis-à-vis de l' α -synucléine A53T dépendait de l'activité kinase du domaine C-terminal de LRRK2.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'effet de ΔLRRK2 (et sa mutation G2019S), sur la neurotoxicité de l' α -synucléine mutée A53T, par l'utilisation de vecteurs viraux (AAV2/6) permettant une transduction sélective des neurones dopaminergiques, chez le rat. Ces vecteurs AAV permettent l'expression de ΔLRRK2 , afin de tester son impact sur la toxicité de l' α -synucléine mutée A53T. Pour déterminer le rôle de l'activité kinase, nous avons utilisé une forme mutée artificiellement de ΔLRRK2 qui ne présente pas d'activité kinase ($\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S/D1994A}}$).

Publication n°2: *The overexpression of the C-terminal fragment of LRRK2 harboring the G2019S substitution in dopaminergic neurons increases the neurotoxicity of mutant A53T α -synuclein in the rat substantia nigra. Cresto et al. En préparation*

Résultats

7 RÉSULTATS

7.1 ARTICLE 1

7.1.1 CHOIX DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE ET DES OUTILS DE VECTORISATION

Dans les expérimentations relatives à l'article 1, nous avons utilisé des vecteurs lentivaux, ainsi que des adéno-virus associés (AAV) pour sur-exprimer la partie C-terminale de LRRK2 (Δ LRRK2), spécifiquement dans les neurones de la SNC.

Comme rappelé plus haut, l'utilisation de vecteurs viraux, faciles à produire et à manipuler pour surexprimer LRRK2, pourrait constituer un avantage non négligeable pour étudier les mécanismes physiopathologiques des mutations de LRRK2, et, à terme, étudier *in vivo* de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant LRRK2. Les vecteurs lentiviraux et AAVs répondent à ces critères. En effet, afin d'étudier les possibles effets toxiques dans les neurones de LRRK2, nous avons la nécessité, (1) d'infecter toute la substance noire, (2) d'exprimer un niveau important de transgène par cellule, (3) d'induire une expression neuronale spécifique de nos transgènes, (4) et de favoriser une expression des transgènes à long terme, (5) sans induire une forte réponse immunitaire qui pourrait perturber l'interprétation des résultats.

Le laboratoire est spécialisé, depuis plusieurs années, dans la production de vecteurs lentiviraux et adéno-virus associés, pour les études *in vivo*. Néanmoins, la capacité de clonage limitée des lentivirus et AAV (respectivement 7 et 5 kb) ne permet pas de les utiliser pour surexprimer efficacement *in vivo* la protéine LRRK2 entière qui correspond à une région codante de plus de 7500 bases. Pour cette raison, nous avons choisi de surexprimer uniquement la partie C-terminale de la protéine [1330-2527 a.a.]. Celle-ci contient, non seulement, le domaine kinase mais également les domaines adjacents (ROC-COR et WD40) qui au sein de la protéine, jouent tous deux un rôle indispensable pour que la protéine puisse avoir une activité kinase/catalytique similaire à celle mesurée pour la

protéine LRRK2 entière. Par ailleurs, ces domaines sont également indispensables pour que la mutation G2019S conduise à une augmentation notable (~2 à 3 fois) de l'activité kinase par rapport à la forme sauvage de LRRK2.

Nous avons généré le fragment Δ LRRK2 dans sa forme sauvage (Δ LRRK2^{WT}) et mutée G2019S (Δ LRRK2^{G2019S}) compatibles avec leur insertion dans un vecteur lentiviral ou AAV.

La forme tronquée Δ LRRK2 étant « artificielle » et différente de la protéine LRRK2 entière, nous avons cherché à montrer qu'elle pouvait, en partie, se comporter comme la forme entière. Les fragments Δ LRRK2 ont été soumis à une « batterie de tests » biochimiques, afin de caractériser les activités enzymatiques kinase par un test de phosphorylation de la protéine MBP. Des analyses ont également été conduites pour déterminer leur capacité à se dimériser, comme le fait la protéine entière.

L'expression et la toxicité de Δ LRRK2 a été évaluée à différents temps, après injection des différents vecteurs par des études comportementales (catwalk), et par comptage stéréologique du nombre de neurones dopaminergiques.

Neuron selective overexpression of the C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation produces neurodegeneration of the substantia nigra.

Noémie Cresto^{1,2}, Marie-Claude Gaillard^{1,2}, Elsa Diguët^{1,2,3}, Déborah Bellet^{1,2}, Laurine Legroux^{1,2}, Laetitia Francelle^{1,2}, Julien Mitja^{1,2}, Gwenaëlle Auregan^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Diane Houitte^{1,2}, Charlène Josephine^{1,2}, Fanny Petit^{1,2}, Caroline Jan^{1,2}, Noëlle Dufour^{1,2}, Alain Joliot⁴, Philippe Hantraye^{1,2}, Gilles Bonvento^{1,2}, Alexis-Pierre Bemelmans^{1,2}, Karine Cambon^{1,2}, Nicole Déglon^{1,5,6}, Emmanuel Brouillet^{1,2} §

¹ CEA, DRF, I²BM, Molecular Imaging Research Center (MIRCen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

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

³ Institut de Recherche SERVIER, Neuropsychiatry Department, 125 chemin de ronde, 78290 Croissy sur Seine, France

⁴ Homeoprotein and Plasticity, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS, INSERM, PSL Research University, Paris, France.

⁵ Lausanne University Medical School (CHUV), Department of Clinical Neurosciences (DNC), Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LNCM), Lausanne, Switzerland

⁶ 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^{G2019S}) is the most prevalent mutation associated with Parkinson's disease (PD). In transgenic models, LRRK2^{G2019S} produces only a minimal loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). Conversely, the intrastriatal injection of adenoviral vectors (Adeno) or herpes simplex virus (HSV) encoding LRRK2^{G2019S} produces early loss of DA neurons which likely results from high levels of expression of the mutant protein. However, whether cell-autonomous mechanisms are sufficient to trigger the degeneration of DA neurons in these models is unknown. To address this question, we investigated whether the overexpression of LRRK2^{G2019S} using lentiviral vectors (LVs) and adeno-associated virus (AAV2/9), which can overexpress transgenes selectively in neurons could trigger neurodegeneration in the SNc. Because of the limited cloning capacity of these vectors, we generated constructs corresponding to the C-terminal domain of LRRK2 (Δ LRRK2). In biochemical assays performed *in vitro*, the kinase activity of Δ LRRK2^{G2019S} was more than two fold higher than that of Δ LRRK2^{WT}, as seen with full length LRRK2. Six months after infection of the SNc with LV- Δ LRRK2^{G2019S}, the number of DA neurons was unchanged. Infection of the SNc with AAV2/9 led to neuronal expression of Δ LRRK2^{WT} and Δ LRRK2^{G2019S} at much higher levels than those obtained with LVs. Six months after the infection of the SNc with AAV- Δ LRRK2^{G2019S} but not with AAV- Δ LRRK2^{WT} a significant ~30% loss of DA neurons was found. The present study suggests that neuronal overexpression of the mutant kinase domain of LRRK2 is sufficient to trigger neurodegeneration in the SNc in the adult brain.

HIGHLIGHTS

- New LVs and AAVs were developed to study the effects of a C-terminal fragment of LRRK2
- Δ LRRK2^{G2019S} [1326-2527 a.a.] possesses a kinase activity reminiscent of that of full length protein
- *In vivo*, Δ LRRK2^{G2019S} leads to DA neurodegeneration

Keywords

Parkinson's disease

Leucin-rich repeats kinase 2

Lentiviral vectors

Abbreviations

Δ LRRK2 RCK plus the WD40 domain

ANK Ankyrin

ARM Armadillo

ATP Adenosine triphosphate

BSA Bovine serum albumin

COR C-terminal of ROC

DA Dopaminergic

GFP Green fluorescent protein

GS G2019S mutation

GWAS Genome-wide association studies

HA Hemagglutinin tag

K Kinase domain of LRRK2

LRR Leucin-rich repeats

LRRK2 Leucin-rich repeats kinase 2

LV Lentivirus

MBP Myelin basic protein

PBS Phosphate buffer saline

PD Parkinson's disease

RCK Kinase domain plus the ROC-COR domain

ROC Ras-of-complex protein

SNc Substantia nigra *pars compacta*

SNPs single-nucleotide polymorphisms

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 α -synuclein protein (Braak and Braak, 2000). The cause of DA neuron degeneration is poorly understood. PD is mostly sporadic, but a genetic origin is identified 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 *LRRK2* (Leucin-rich repeat kinase 2) gene are the most common genetic cause of both familial and sporadic PD (Paisán-Ruíz 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 decreased in the risk of developing PD, consistent with a key role for LRRK2 in PD pathogenesis (Nalls et al., 2014; Satake et al., 2009). 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*^{G2019S}) are unknown. 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 autophosphorylation and the phosphorylation of substrates) and there is compelling evidence to suggest that the neurotoxicity of LRRK2^{G2019S} is linked to an increase in the kinase activity of this protein (Lee et al., 2010; West et al., 2007).

Intriguingly, transgenic and knock-in genetic models have been developed, in rodents expressing LRRK2^{G2019S}. 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). Interestingly, the intrastriatal injection of an HSV amplicon (HSV) and an adenovirus (Adeno) encoding LRRK2^{G2019S} in the mouse and rat striatum respectively, produces a partial but relatively rapid degeneration of DA neurons (Dusonchet et al., 2011; Lee et al., 2010). The results obtained in these models suggest that high levels of LRRK2^{G2019S} expression are required to trigger cell death in young adult rodents. Since injection of these vectors does not lead to selective transduction of DA neurons after intrastriatal injections, these observations also suggest that expression of LRRK2^{G2019S} in different cell types (DA neurons, striatal neurons, astrocytes, and microglia) may play a role in DA cell loss in the HSV/Adeno models. In other words, mechanisms of degeneration of DA neurons in these models may not be cell-autonomous.

Here, we investigated whether an increase in the kinase activity of LRRK2^{G2019S} 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 virus (AAV2/9), which can overexpress transgenes selectively in neurons. Because of the limited cloning capacity of these vectors, we generated constructs corresponding to the C-terminal domain of LRRK2. First, we characterized in assays performed *in vitro*, the kinase activity of the C-terminal fragment [1326-2527 a.a.] of wild-

type (Δ LRRK2^{WT}) and G2019S mutant (Δ LRRK2^{G2019S}) forms of LRRK2 to determine whether this fragment could behave, at least in part, like the full length protein. To directly investigate whether the Δ LRRK2 fragments could be toxic *in vivo*, LVs and AAVs coding LRRK2^{G2019S} or LRRK2^{WT} were injected stereotaxically into the SNc of adult rats and a longitudinal evaluation was performed to assess potential effects on motor performance and DA neuron survival.

Materials and methods

Viral construction and production

Lentivirus. DNA sequences encoding GFP and the C-terminal part of human LRRK2 (K, RCK and Δ LRRK2 fragments) 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- Δ LRRK2 containing the WT or G2019S forms. 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 293T cell by a four plasmid transient transfection system (Naldini et al., 1996). The supernatant was collected 48 h 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 resuspended in 1% BSA in PBS, frozen and stored at -80°C . LV- Δ LRRK2 were used at a concentration of 100 ng/ μl p24.

Adeno-associated viral vector (AAV). Plasmids 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 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 iodixaniol density gradient followed by dialysis against PBSMK (0.5 mM MgCl₂ 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).

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 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 ± 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 (Fig. 1, B and C). We injected 2 μ l of virus at a concentration of 100 ng for lentiviruses and 5×10^{10} viral particles for AAV into each site, with a 34-gauge blunt-tipped needle linked to a 10 μ l Hamilton syringe by a polyethylene catheter, at a rate of 0.25 μ 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 pawprint 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 µm 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% H₂O₂ 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, 6th 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% H₂O₂. 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).

Cell studies

Human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% bovine calf serum, 1% L-glutamine and antibiotics

(50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin), under an atmosphere containing 5% CO₂. For the study of recombinant ΔLRRK2, cultured cells were seeded on wells and transfected by CaCl₂ transfection methods with the different forms of ΔLRRK2 vectors.

Biochemical analysis

Western blotting

Overall levels of fragment expression were determined by lysing cells in modified RIPA buffer: 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 13000 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 with primary antibodies against actin (1: 5000, rabbit, Sigma), and, for the detection of transgenes, with antibodies against HA (1:3000, mouse, Covance) and AT106 (1:1000, rabbit, Enzo Life Sciences). The membranes were washed three times, with 0.1% Tween-20 in TBS (TBS-T), for 10 min each. For chemiluminescence-based detection, membranes were labelled with secondary IgG-HRP antibodies raised against the corresponding primary antibodies. The membranes were washed three times with TBS-T and incubated with ECL chemiluminescence 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 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

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.

Kinase activity assay

The 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 MgCl₂; 5µCi ³²P-ATP (1 mCi, BLU502Z001MC, PerkinElmer)] to activate the reaction, and reaction mixture was then incubated at 30°C for 30 min with gentle agitation. 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 biochemistry. 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 was 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.

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. The annotations used to indicate the level of significance are as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results

Before producing and comparing the transduction efficiencies and biological effects of the LVs and AAVs encoding the different C-terminal fragments of LRRK2 [1326-2527 a.a., wild-type ($\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$) and G2019S mutant ($\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$), we first characterised the expression plasmids after the transfection of cultured human HEK293 cells.

Functional activity and biochemical characterisation

The expression of the ΔLRRK2 fragment was first evaluated *in vitro* after the transfection of HEK293T cells with or without the G2019S mutation. We added an HA tag to the C-terminus of the construct (Fig. 1, A). After protein extraction in buffer with non-ionic detergents (NP40 and Triton X100), western blot analysis after (denaturing) SDS-PAGE showed that the fragments migrated at their expected molecular weight at 142 kDa, demonstrating an absence of abnormal cleavage or instability (Fig. 1, B). The detection and the quantification were done with the HA tag and with an antibody that recognize specifically human LRRK2 (AT106, aa 1838-2133), suggesting that the folding of the fragments was similar with the full-length LRRK2 protein. No difference of expression was detected between the WT and G2019S form (Fig. 1, C). Expression of the recombinant proteins after transfection showed diffuse cytoplasmic localization, with no obvious inclusion bodies. Similar localization and levels of expression were seen with $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ and $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$.

The higher level of kinase activity observed for LRRK2^{G2019S} than for the wild-type LRRK2 is thought to be a key molecular aspect of its neurotoxicity (Lee et al., 2010; 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). We assessed the biochemical activity of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ in comparison with the activity of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ by performing kinase activity assays with ³²P-γ-ATP in the presence of the pan-kinase substrate myelin basic protein (MBP) (Fig. 2, D-E). We also compared the activity of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ with the activity of the kinase domain alone (K) and that of K with the adjacent ROC-COR domain (RCK) (Fig. 2, B-C). Recombinant proteins were purified by HA-mediated immunoprecipitation after the transfection of HEK cells. In this radioactive assay with ³²P-γ-

ATP, the radioactivity of the different kinase fragments and the radioactivity of the substrate MBP were assessed after separation by SDS-PAGE. Δ LRRK2^{G2019S} displayed detectable autophosphorylation similar to that reported in previous studies for the (1326-2527 aa) Δ LRRK2 (Kamikawaji et al., 2009). The small K and RCK showed no detectable autophosphorylation.

An analysis of ³²P incorporation into the MBP substrate was performed to determine the phosphorylation activity of the different LRRK2 fragments. In parallel, the levels of immune-precipitated recombinant fragments were evaluated by western blotting with an antibody directed against the HA tag (see Figure 2A, non-radioactive fraction) and used to normalize MBP phosphorylation to the amount of LRRK2 fragments for more precise comparison of the kinase activity. In this assay, immune-precipitated levels of K^{G2019S} and RCK^{G2019S} were high, whereas both peptides had low levels of kinase activity (Fig. 2, B-C). Activity of K^{G2019S} was lower than the activity of RCK^{G2019S}. Conversely, immune-precipitated Δ LRRK2^{G2019S} levels were lower than those detected with K and RCK, consistent with lower level in the input fraction before pull-down (Fig. 2, B). However, Δ LRRK2^{G2019S} had much higher levels of phosphorylation activity than the smaller fragments. We also compared the catalytic activity of Δ LRRK2^{G2019S} with that of the corresponding wild-type form, Δ LRRK2^{WT}. Both proteins were present at the same levels in the pull-down fractions. MBP phosphorylation levels were higher with Δ LRRK2^{G2019S} than with Δ LRRK2^{WT}, suggesting that the G2019S substitution had indeed increased the kinase activity of this C-terminal fragment of LRRK2 (Fig. 2, D-E). Thus these results suggested that LRRK2^{G2019S} retains, at least in part, cellular and biochemical characteristics of the full length LRRK2^{G2019S} protein, especially the presence of a molecular “switch” induced by G2019S mutation, leading to increase kinase activity as previously reported for other c-terminal fragments and the full length LRRK2 protein (Jaleel et al., 2007).

Characterisation of LVs-induced transduction in the rat substantia nigra

At low magnification, Δ LRRK2 fragments were detected in a large proportion of cells in the SNc (Fig. 3, 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 staining in the cytoplasm and dendrites.

The pattern and intensity of staining were similar for both Δ LRRK2 forms (Fig. 3 A, B). Transduction of other type of cells instead neurons have never been observed.

In vivo experiments with LV to study the potential toxic effects of Δ LRRK2^{G2019S}

We evaluated the potential toxicity of Δ LRRK2 to dopaminergic neurons *in vivo*. LV- Δ LRRK2^{WT} or LV- Δ LRRK2^{G2019S} were injected into the SNc (200 ng per site). Rats were subjected to the Catwalk® test 25 weeks after injection, for the detection of motor deficits (Fig. 4). Three days later, the rats were euthanatized for histological evaluation (Fig. 5). We injected LVs encoding WT forms into the left hemisphere, and LVs encoding G2019S forms, which we thought might be toxic, into the right hemisphere (Fig. 4, A). In addition, a control group received injections of vehicle (PBS/BSA) and a LV encoding GFP. 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, including maximal contact area, mean stride length and mean swing speed (Fig. 4, B), 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 WT forms, and the left front limb, corresponding to the right SNc infected with LVs encoding G2019S forms, separately. No significant asymmetry was 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 receiving injections of PBS/BSA and LV-GFP.

We then investigated the integrity of the nigrostriatal pathway, by counting the dopaminergic neurons section by section, which displayed TH staining, in the injected part of the SNc (Fig. 5, A-C). Low-magnification observations revealed no marked loss of TH-positive cells, even in the vicinity of the injection site (Fig. 5, A, B). Based on the minimal loss of TH staining due to the individual LRRK2 fragments, 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. The apparent density of TH-positive cells in this part of the SNc, 25 weeks after infection, did not differ significantly between wild-type and G2019S LRRK2 fragments, or

between these fragments and the control (GFP) (Fig. 5, C). 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 that it could be observed with AAV. We compared the transduction efficacy of lentivirus and AAV encoding for the GFP protein at 1 month after stereotaxic injection. Results showed that the transduction by AAVs was higher than that it obtained with LVs by approximately 10 fold (Fig. 6 A, B). Moreover, the transduction of cells by the AAV2/9-GFP was continuous throughout the SNc that was not the case for the LV-GFP (Fig. 6, C).

Characterisation of AAVs-induced transduction in the rat substantia nigra

AAV2/9 encoding either $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ or $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ under the PGK promoter was injected into the SNc of adult rats. AAVs preparations (batches) were diluted to similar concentrations (5×10^{10} viral particles/ μl) and 2 μl of the final preparation was injected in each case. As described for the LVs experiments, we carried out immunofluorescence analyses with the HA tag to determine the distributions of the wild-type and mutant ΔLRRK2 fragments in the SNc. Histological evaluations showed that all transduced cells expressing ΔLRRK2 (WT or G2019S) had a neuronal phenotype. Transduction of other type of cells instead neurons have never been observed. Fluorescence was localized in the cytoplasm. Similar levels of expression were observed with AAV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ and AAV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ (Fig. 7, A, B).

In vivo experiments with AAVs, to study the potential toxic effects of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$

We evaluated the potential toxicity of AAV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ or AAV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ to dopaminergic neurons *in vivo* after injected into the SNc. In this case, AAVs were injected bilaterally into the SNc. A control group received injections of vehicle (PBS pluronic acid). As in the studies with LVs, 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 receiving injections of vehicle (Fig. 8). Rats were also subject to the open field 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. 9, A-B). 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, differs significantly between rats infected with AAV- Δ LRRK2^{WT} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} (Fig. 9, B). The number of neurons was similar between the PBS group and the Δ LRRK2^{WT} with approximately 10000 neurons counted. We observed a 30 % decrease of DA neurons in the group injected with Δ LRRK2^{G2019S} as compared to the two others groups. In conclusion, neuronal overexpression of the mutant form of Δ LRRK2 but not its WT form induced neurodegeneration of the nigro-striatal pathway six month 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 specifically in neurons the C-terminal part of LRRK2 harbouring the G2019S mutation in the DA neurons of the rat SNc. Biochemical experiments demonstrated that the Δ LRRK2 with the G2019S substitution studied here was “biochemically” active *in vitro* in phosphorylation tests. While, quantitative histological studies indicated that the overexpression did not result in a loss of TH-positive SNc DA neurons or striatal DA terminals when Δ LRRK2^{G2019S} was expressed by LVs, results with AAVs showed that Δ LRRK2^{G2019S} induced 30 % of DA neuron loss. Under no circumstances, behavioural tests indicated motor anomalies in the rats overexpressing Δ LRRK2, even the most “biologically active” fragment, Δ LRRK2^{G2019S}.

A biochemical comparison between Δ LRRK2^{WT} and Δ LRRK2^{G2019S} was performed before the insertion of this fragment into LVs or AAVs. We also compared Δ LRRK2 with the fragment containing the kinase domain only (KIN), and with the fragment containing the kinase domain the ROC-COR domain (RCK). Δ LRRK2 had relatively high levels of phosphorylation

activity, which was significantly increased by the presence of the G2019S substitution. The higher kinase activity of the Δ 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). We investigated whether the “biochemically” active Δ LRRK2^{G2019S} fragment could induce a biological effect when expressed in neurons.

At the time point considered (6 months after infection), rats overexpressing Δ LRRK2^{G2019S} 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 Δ LRRK2^{G2019S}. In contrast, while the expression level Δ LRRK2 with AAV was lower in comparison with LVs, rats overexpressing AAV encoding for Δ LRRK2^{G2019S}, displayed 30 % of neuronal loss. We showed that at one month post-injection the protein expression level was 10 fold higher with AVVs as compared to LVs. These results suggested that in addition to the mutation, the level of LRRK2^{G2019S} expression in the few weeks after injection was crucial to trigger a toxic effect.

Our results are consistent with published results, including those of studies on G2019S knock-in mice (Yue et al., 2015) and BAC-transgenic rats overexpressing G2019S LRRK2 (Lee et al., 2015). In these genetic models, no dopaminergic cell loss or no major motor deficits were observed, even in aged animals. This lack of effect may be due to the low level of LRRK2^{G2019S} 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 copies per cell) (Ruiz and Déglon, 2012). Our results are, therefore, more directly comparable with those of two 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). In these two models, LRRK2^{G2019S} overexpression led to the partial degeneration of DA

neurons in the SNc. These two studies used viral vectors that underwent retrograde transport (which is not the case for the LVs and AAVs vectors used here). SNc neurons are transduced along with other cells in the striatum following the injection of viral vectors. It remains unclear whether the DA neuron degeneration induced by LRRK2^{G2019S} in the adenovirus and HSV 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, the biochemically active Δ LRRK2^{G2019S} was overexpressed only in DA neurons and we found a comparative DA neuronal loss.

The LRRK2 fragments studied 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. However, our study of the biological effects of Δ LRRK2^{G2019S} in particular, provides interesting tools for the precise evaluation *in vivo*, and, more specifically, in neurons, of the role of the kinase and neighbouring domains. These constructs are also versatile tools for studies of the effects of increases in the kinase activity of LRRK2^{G2019S} in different brain cells. For example, driving Δ LRRK2 expression with the GFAP promoter might be an interesting approach for studying the selective role of LRRK2 (WT and G2019S) kinase domains 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 those in other brain regions.

LRRK2 has also been shown to interact physically or genetically with several other important proteins involved in PD. Potential interactors of LRRK2 include the α -synuclein protein (Lin et al., 2009). LRRK2 may impair α -synuclein degradation or act synergistically with α -synuclein to impair mitochondrial function (Daher et al., 2015). Daher *et al.* showed that rats expressing G2019S LRRK2 had exacerbated dopaminergic neurodegeneration and inflammation in the presence of α -synuclein overexpression (Daher et al., 2015). This

suggests that the toxic gain of function of LRRK2^{G2019S} in PD requires α -synuclein species capable of rapid aggregation, inducing neurotoxicity.

Conclusions

In conclusion, we present a novel molecular platform for studying the effects of the C-terminal part of LRRK2 in neurons, *in vivo*. Our results indicate that a low expression level of Δ LRRK2^{G2019S} is not sufficient to induce neurodegeneration *in vivo*, in DA neurons. However, a selectively high expression in DA neurons of Δ LRRK2^{G2019S} is sufficient to induce DA neuronal loss. These results suggest that both the expression level and the G2019S substitution-induced increase in kinase activity of the overexpressed LRRK2 fragment are required to trigger cell death pathways.

Figures

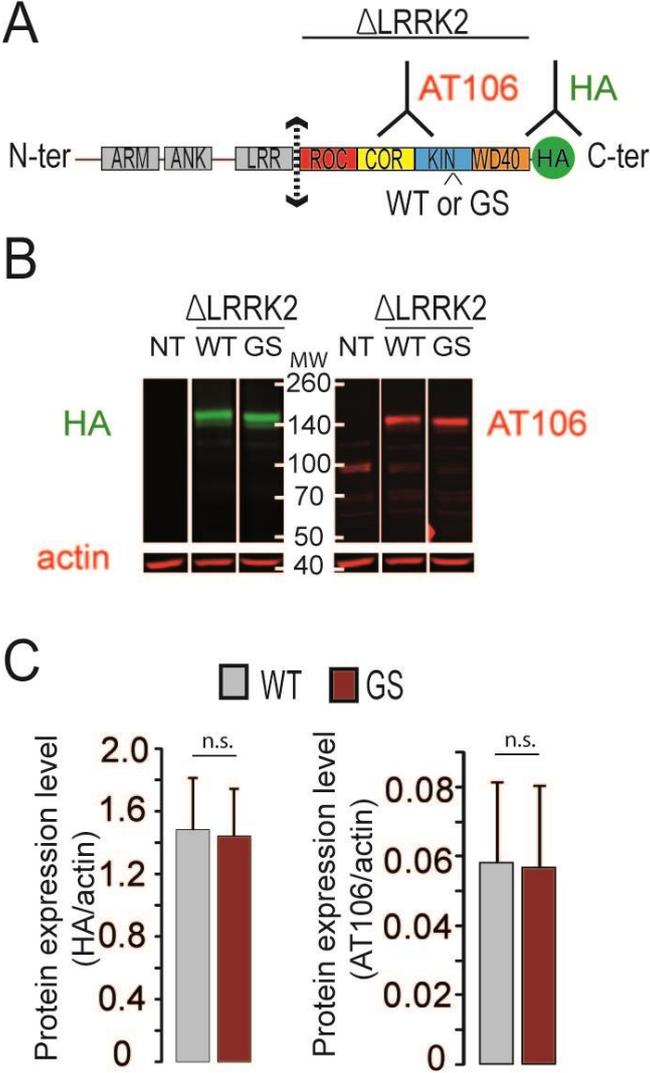


Figure 1: (A) A plasmid coding for the C-terminal part of LRRK2 (Δ LRRK2) containing the GTPase domain (ROC/COR), the kinase domain (KIN) and the WD40 domain with the addition of the hemagglutinin tag (HA) was synthesized in the WT or G2019S form. **(B)** Western blot analysis after (denaturing) SDS-PAGE showed that the fragments migrated at their expected molecular weight at 142 kDa with the HA antibody and with the AT106 antibody with no signal in the non-transfected cells (NT). **(C)** The quantification based on the HA and AT106 detection showed that the protein expression was similar between the WT and G2019S forms. Unpaired Student’s *t* test for comparison; n.s.: non-significant.

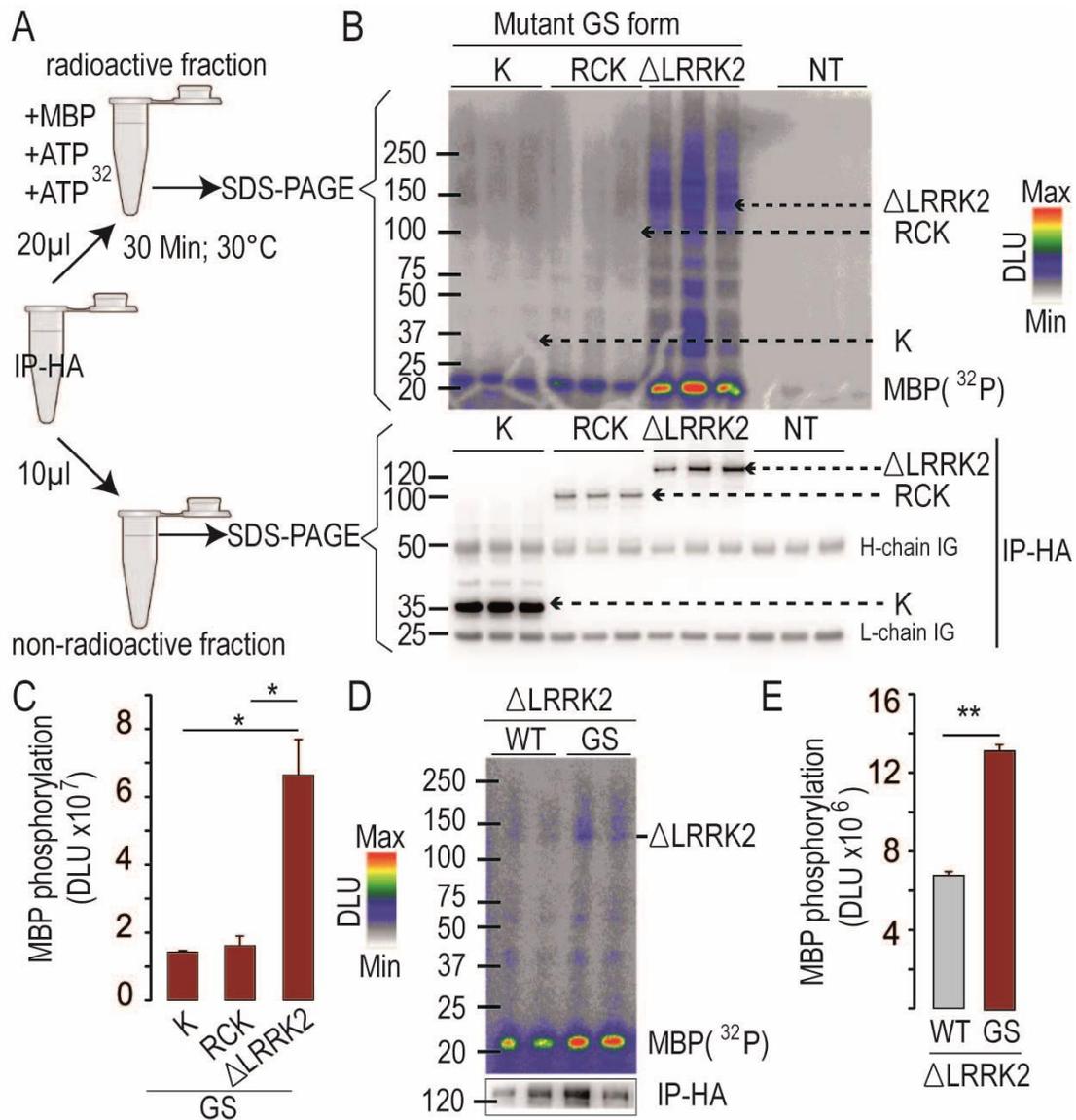


Figure 2: Biochemical characterization of the C-terminal fragments of LRRK2. Fragments were purified by HA-mediated immunoprecipitation. A portion of the magnetic beads was used to study the levels of recombinant fragments by western blotting (IP-HA). The rest of the beads were incubated with radioactive ^{32}P -ATP and myelin basic protein (MBP) as a kinase substrate (**A**). After incubation, K, RCK and ΔLRRK2 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. (**D**) ^{32}P -incorporation into MBP after incubation in the presence of wild-type (WT) ΔLRRK2 , relative to incorporation in the presence of ΔLRRK2 carrying the G2019S mutation. (**C, E**). Quantification of ^{32}P -incorporation into MBP. *, $p < 0.05$; One-way ANOVA with Bonferroni correction. **, $p < 0.01$, Student's t test.

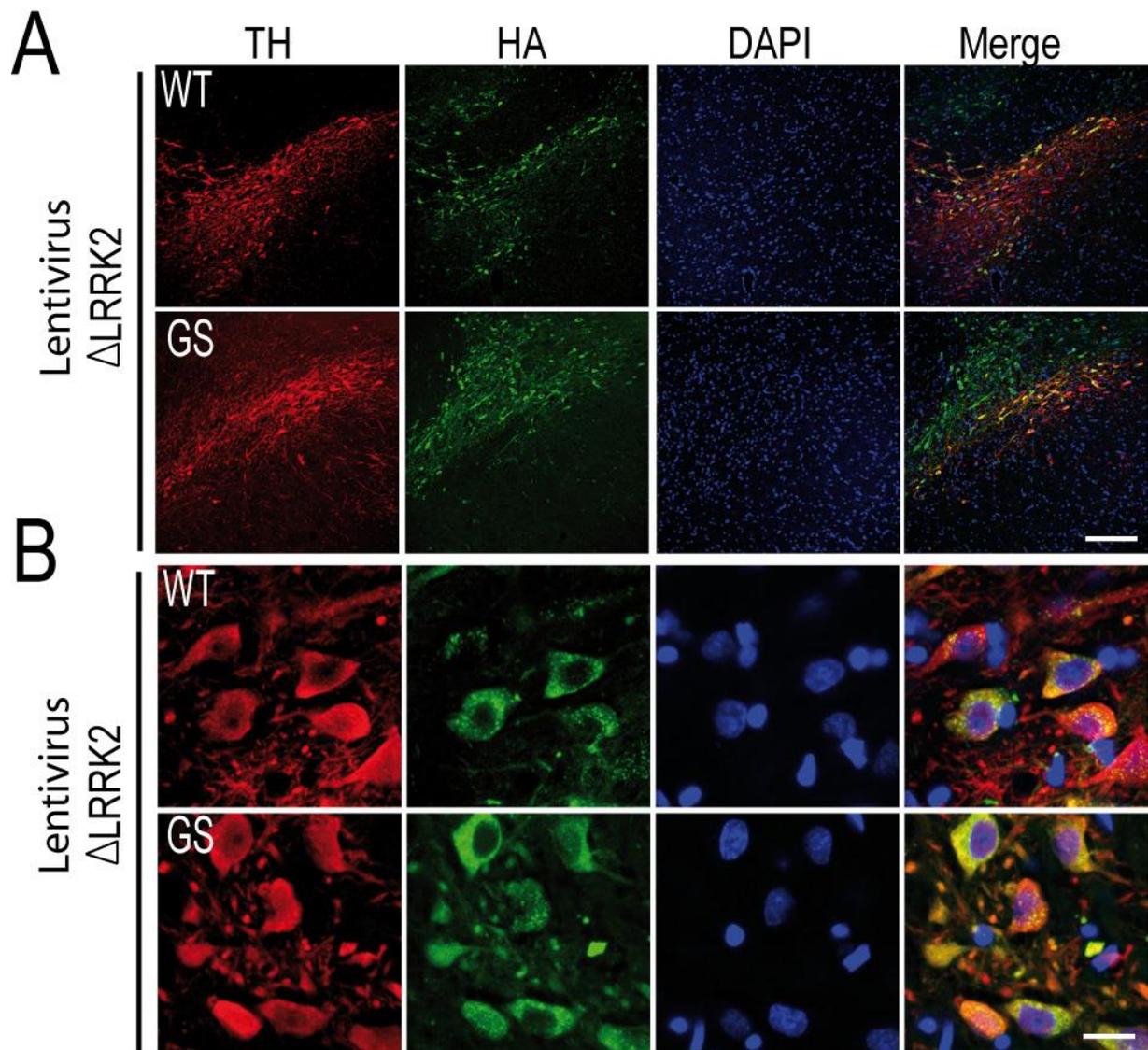


Figure 3: In vivo expression in the SNc. (A) Double-immunofluorescence labelling and confocal microscopy were used to evaluate the specificity of LV-ΔLRRK2WT and LV-ΔLRRK2G2019S for DA neurons in the SNc. Scale bar: 400 μm. (B) Higher magnification showing SNc neurons co-expressing TH and LRRK2 fragments. Note that 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: 10 μm.

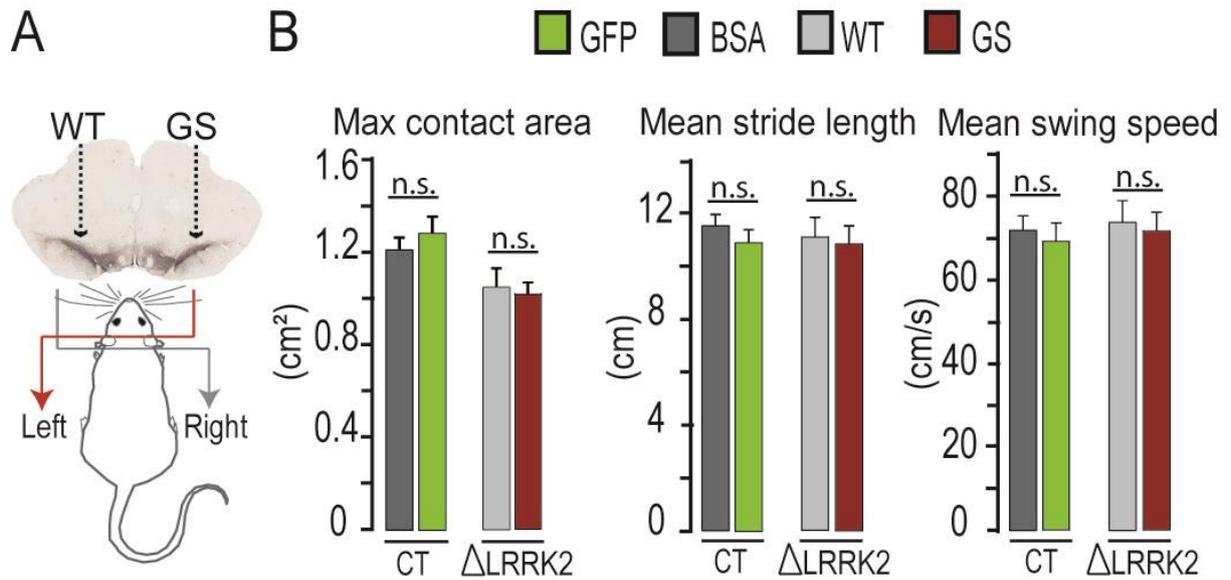


Figure 4: Motor performance of rats receiving injections of WT or G2019S LV- Δ LRRK2 and GFP in the SNc, measured 25 weeks after injection. The gait of the rats was evaluated in the Catwalk apparatus. We analysed the right forelimb, corresponding to the contralateral SNc infected with a LV encoding wild 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).

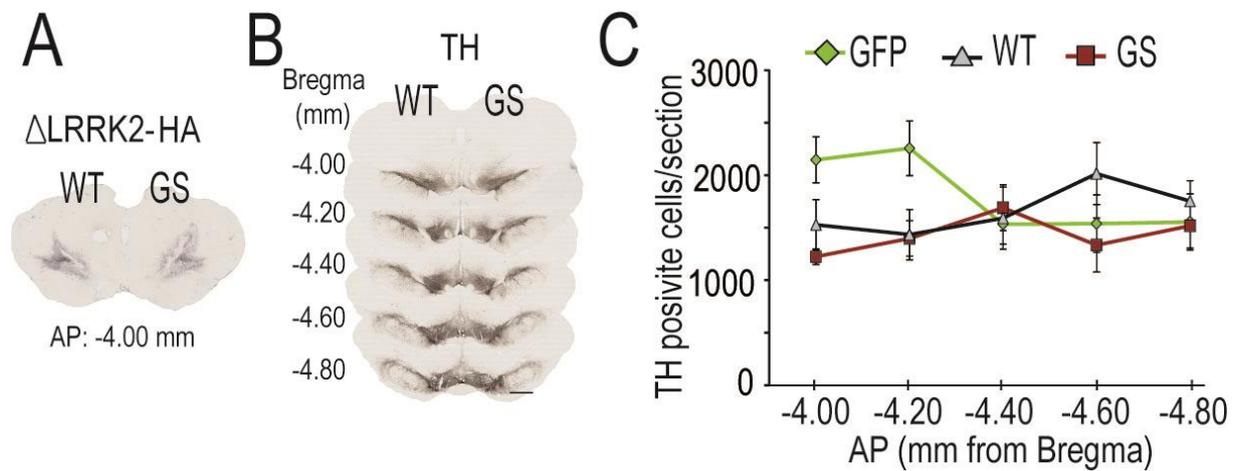


Figure 5: Histological evaluation of the effects of wild-type and G2019S LV- Δ LRRK2 in the SNc, 25 weeks after injection. Lentiviral vectors encoding the Δ LRRK2 fragments or GFP as a control were injected into the SNc. **(A)** Representative histological sections of the SNc after immunohistochemical staining of the fragments with an antibody against the HA-tag. **(B)** Tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry demonstrates an absence of major toxicity for the LRRK2 fragments in the SNc. **(C)** The number of TH-positive neurons was evaluated section per section in the vicinity of the transduction. One-way ANOVA was used for between-group comparison; $n=5/$ group. Scale bar: 750 μ m.

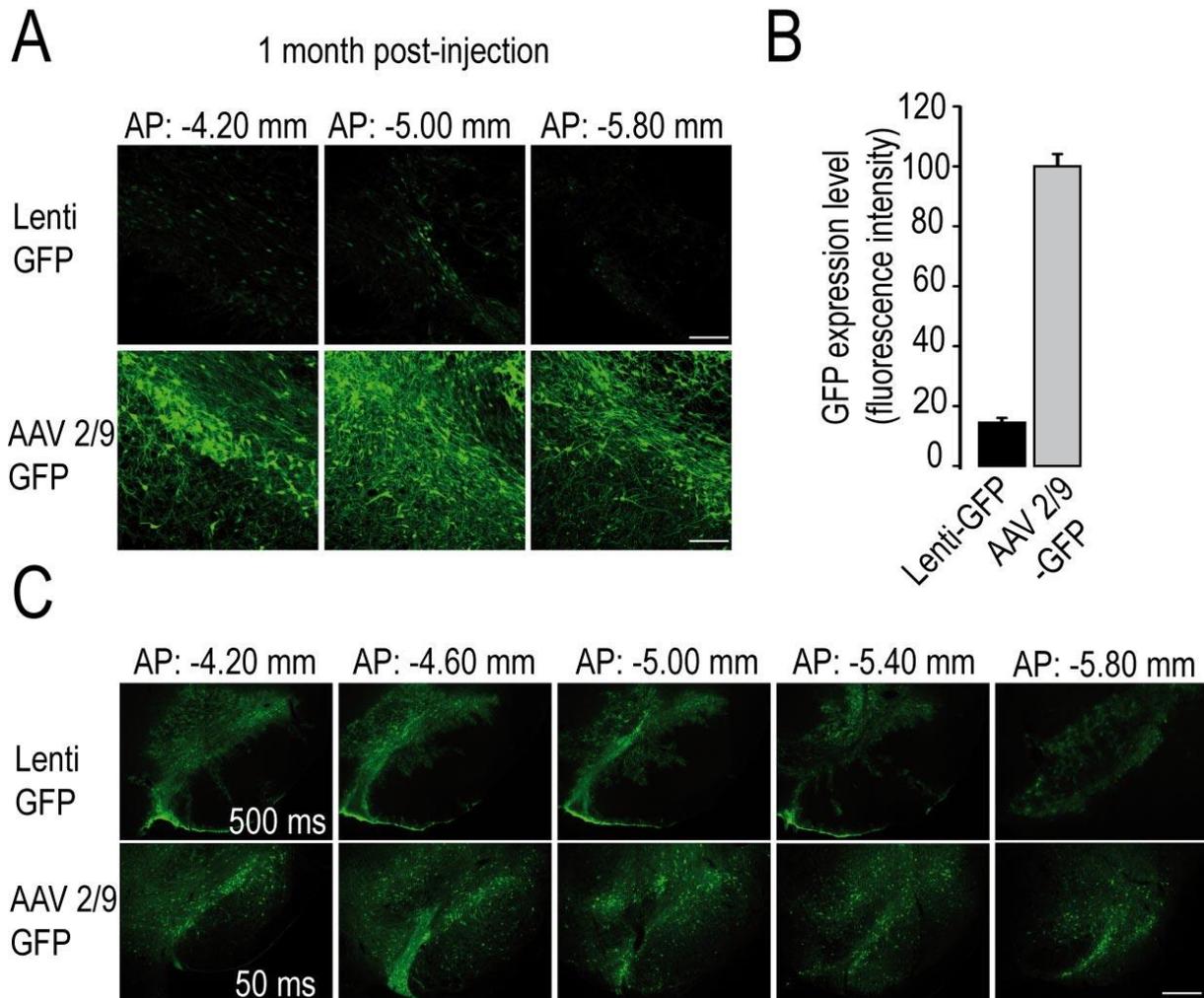


Figure 6: Comparison between AAVs and lentiviral transduction. **(A)** Direct GFP expression was evaluated by confocal microscopy after one month post-injection of LV or AAV coding for the GFP protein. Acquisitions were taken in three different level of the SNc with the same confocal parameters between LV and AAV acquisitions. Scale bar: 400 μ 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 μ m.

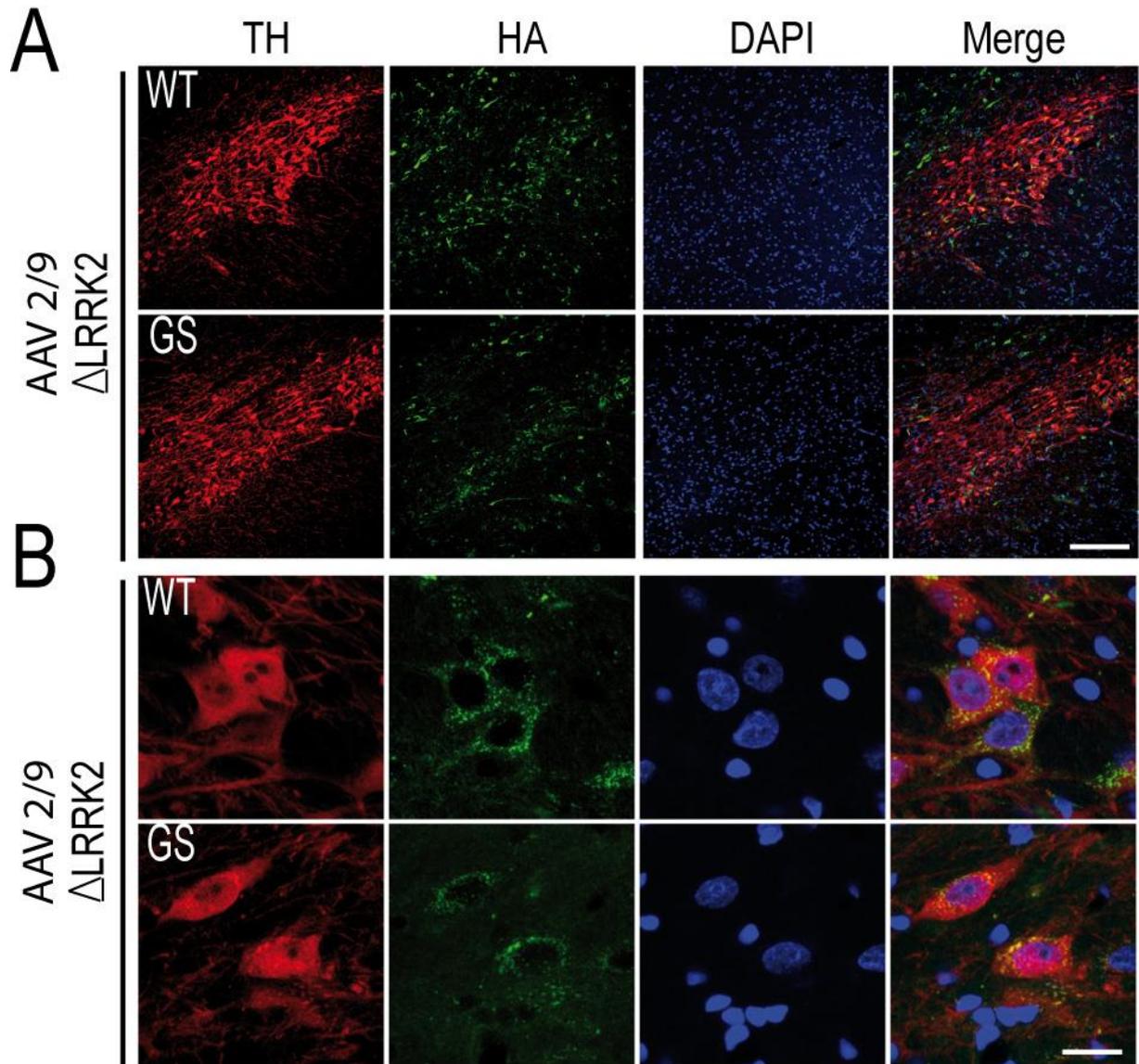


Figure 7: *In vivo* expression in the SNc. (A) Double-immunofluorescence labelling and confocal microscopy were used to evaluate the specificity of AAV- Δ LRRK2^{WT} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} for DA neurons in the SNc. Scale bar: 400 μ m. (B) Higher magnification showing SNc neurons co-expressing TH and LRRK2 fragments. Note that 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: 10 μ m.

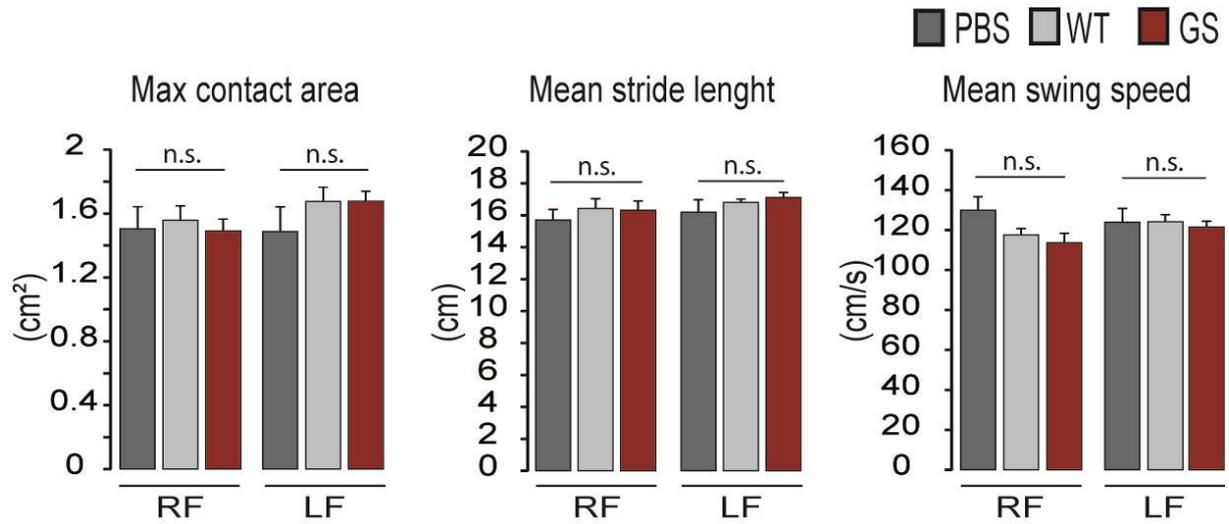


Figure 8: Motor performance of rats receiving injections of WT or G2019S AAV- Δ LRRK2 and PBS in the SNc, measured 25 weeks after injection. The gait of the rats was evaluated in the Catwalk apparatus for the three different groups. We analysed the right forelimb (RF) and the left forelimb (LF). Three 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).

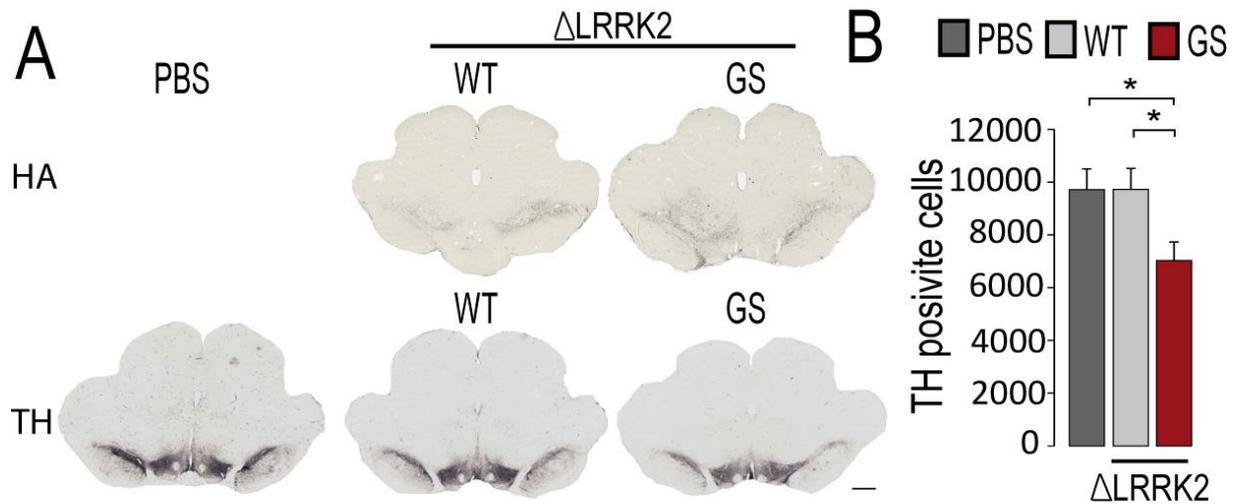


Figure 9: Histological evaluation of the effects of wild-type and G2019S AAV- Δ LRRK2 in the SNc, 25 weeks after injection. AAVs encoding the Δ LRRK2 fragments or PBS as a control were injected into the SNc. **(A)** Representative histological sections of the SNc after immunohistochemical staining of the fragments with an antibody against (HA). **(B)** Tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry in the SNc was performed to evaluate the toxicity. **(C)** The number of TH-positive neurons was evaluated 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. Scale bar: 750 μ 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). 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, 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.
- 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.
- 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 α -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 290, 19433–19444.

- 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.
- 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.
- 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*.
- Kamikawaji, S., Ito, G., and Iwatsubo, T. (2009). Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 10963–10975.
- 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.
- 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.
- 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-Ruíz, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

7.2.1 CHOIX DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE

7.2.1.1 CARACTERISATION DU MODELE A-SYNUCLEINE

Sur la base des expériences réalisées pour répondre à l'objectif 1, nous avons réalisé des expériences de co-injection de vecteurs AAV codant pour l' α -synucléine et codant pour Δ LRRK2, visant à évaluer la possible synergie entre les deux protéines. Dans un premier temps, nous avons caractérisé, au sein du laboratoire, le modèle de Synucléopathie induit par injection d'un vecteur AAV codant pour l' α -synucléine mutée A53T. Nous avons utilisé la forme mutée A53T de l' α -synucléine (α -synA53T) afin d'induire une pathologie synucléine (mort des neurones DA, agrégation de l' α -synucléine, phénotypes moteurs mesurables) dans un laps de temps relativement court, après l'injection des vecteurs. Sur la base des données de la littérature et de nos expériences préliminaires, la forme A53T induit une mort des neurones DA en quelques semaines contre plusieurs mois pour la forme WT (Volpicelli-Daley et al., 2016a). En préambule à nos expériences de co-injection, l' α -synucléine mutée A53T seule a été injectée dans la SNc. Nous avons caractérisé les effets à différents temps, 9, 12 et 15 semaines PI, en mesurant le nombre de neurones DA, ainsi que la présence d'un phénotype moteur. Cette caractérisation fine nous a permis de déterminer la fenêtre de temps compatible pour les expériences de co-injection (Temps référence : T^{ref}).

Nous avons dans un premier temps, comparé la mort neuronale après l'injection des vecteurs AAV codant pour l' α -synucléine WT (α -syn^{WT}) ou mutée A53T (α -syn^{A53T}), dans la SNc de rat. Nous avons déterminé que l'injection de la forme mutée A53T induit une perte neuronale mesurable de l'ordre de 40% comparée à la forme WT de l' α -synucléine, 12 semaine après injection, confirmant que nos vecteurs étaient en mesure de conduire à une toxicité.

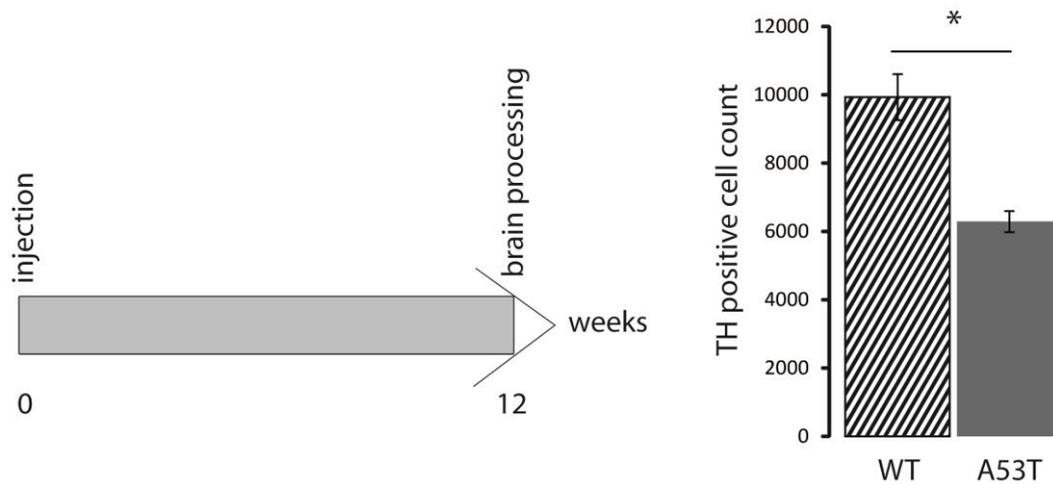


Figure 22: Caractérisation de l'injection d' α -synucléine WT ou A53T dans la SNc.

Les AAV codant pour l' α -syn^{A53T} ou l' α -syn^{WT} ont été injectés dans la SNc de rat. Les comptages stéréologique du nombre de neurones dopaminergiques ont été effectués 12 semaines après infection.

Par la suite, nous avons débuté une caractérisation longitudinale, pour déterminer la fenêtre de temps post-infection (T^{ref}) pour lequel l'expression de l' α -syn^{A53T} conduit à un phénotype détectable et quantifiable mais peu sévère (sur les plans histologique et comportemental), pouvant être augmenté par la co-injection avec Δ LRRK2^{GS}. Les animaux injectés avec l' α -syn mutée A53T présentent, dès 6 semaines, une dissymétrie détectable dans le test du cylindre. Cette dissymétrie perdure et s'amplifie dans le temps. Elle est détectable jusqu'à 15 semaines PI.

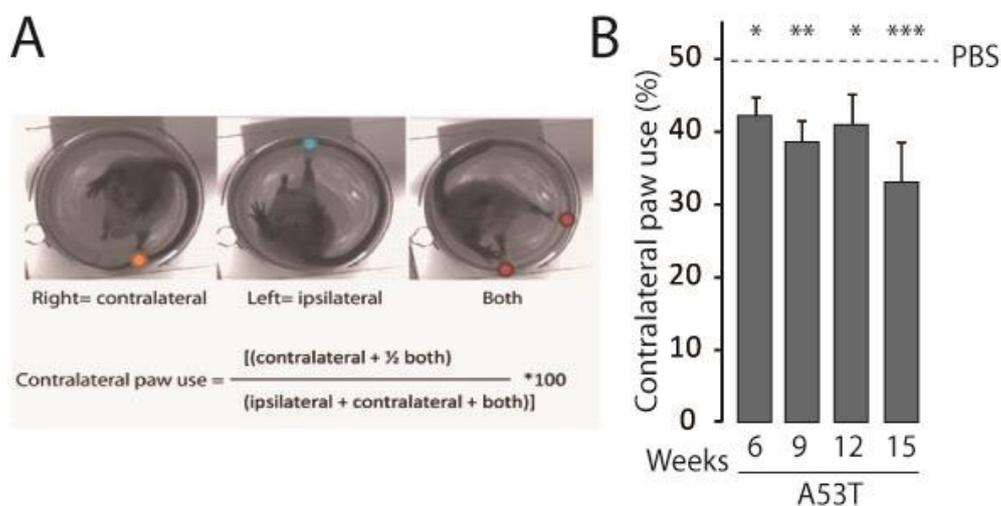


Figure 23: Etude comportementale longitudinale des animaux injectés avec la forme A53T de l'α-synucléine.

(A-B) Les AAV codant pour l'α-syn^{A53T} ont été injectés dans la SNc de rat. Le comportement moteur des animaux a été évalué dans le test du cylindre à 6, 9, 12 et 15 semaines PI.

Les comptages stéréologiques des neurones DA, dans la partie injectée de la SNc à 12 et 15 semaines PI, révèlent une perte significative du nombre de neurones TH positifs, comparé au groupe PBS qui se situe autour des 12000 neurones (environ 40% de perte neuronale). En revanche, aucune différence n'est observée entre la quantification à 12 et 15 semaines PI. L'immunohistologie de la forme phosphorylée de l'α-synucléine montre la présence de cellules positives pour ce marquage à 15 semaines PI. En ce sens, nous avons réalisé un marquage de la thioflavine S (thioS) pour valider que les cellules positives pour la PsynS129 sont positives pour un autre marqueur d'agrégation, comme la ThioS. Les analyses confocales montrent que la ThioS marque, tout comme l'anticorps Psyn129 les agrégats d'α-synucléine.

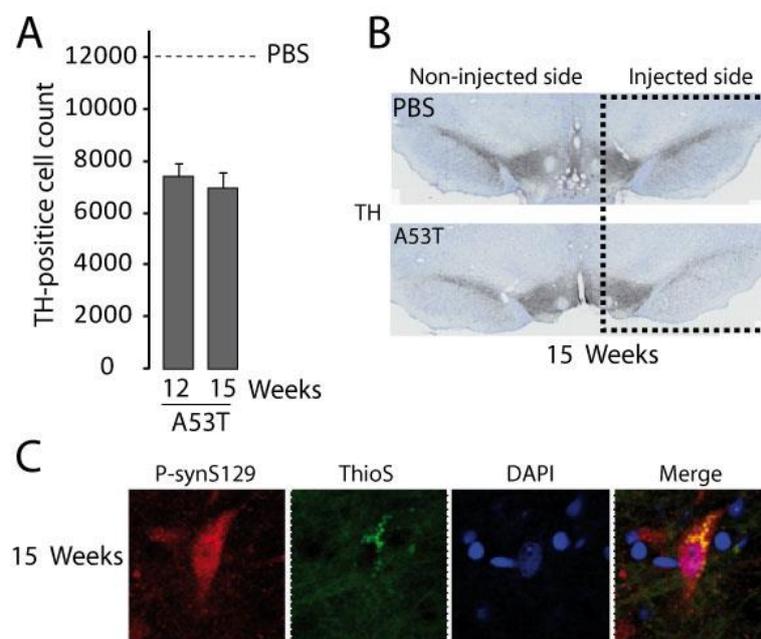


Figure 24: Mesure de la perte neuronale après injection d'α-synucléine A53T

Les AAV codant pour l'α-syn^{A53T} ont été injectés dans la SNc de rat. (A-B) Les comptages stéréologique du nombre de neurones dopaminergiques ont été effectués 12 et 15 semaines après infection. (C) La présence d'agrégats positifs pour la P-αsynS129 et la thioflavine S a

été évalué à 15 semaines.

Nous avons déterminé que le temps 15 semaine PI semblait être le meilleur choix pour notre T^{ref} , car c'est à ce temps que les atteintes comportementales sont les plus marquées, ainsi que la mort neuronale.

Ces expériences préliminaires nous ont permis d'établir un modèle statistique fiable, afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales pour les expériences de co-injection des vecteurs AAV codant pour Δ LRRK2 et l' α -synucléine (nombre de groupes et nombre d'animaux par groupe pour détecter des différences de l'ordre de 15%).

7.2.1.2 OPTIMISATION DU FRAGMENT Δ LRRK2

La toxicité de LRRK2 est dépendante de son activité kinase augmentée. Nous avons vu, dans la partie 3.3, que LRRK2 est une protéine finement régulée par des phosphorylations et notamment par des autophosphorylations (Kamikawaji et al., 2009; Lobbestael et al., 2012; Webber et al., 2011). Le rôle de toutes ces autophosphorylations est peu connu mais ces modifications sont mises en cause dans la régulation de l'activité « ON/OFF » de la kinase. La phosphorylation sur la sérine 1292, située à la liaison entre le domaine LRR et GTPase, semble être l'une des plus importantes. Expérimentalement, sa substitution réduit les effets toxiques de la mutation G2019S (Sheng et al., 2012). De plus, l'autophosphorylation sur cette sérine est augmentée lorsque LRRK2 est muté G2019S. Ceci suggère que cette autophosphorylation est un élément clé dans l'induction de la toxicité. Basé sur ces observations, nous avons optimisé le fragment Δ LRRK2, décrit dans l'article 1, en y rajoutant les quelques acides aminés nécessaires (46 acides aminés) pour inclure à nos constructions la sérine 1292 (aa 1283-2527) (**Figure 25**).

```

aa 1283 -1329 : Ser 1292 : MSFPNEMGKLSKIWDLPDELHLNFDKFKHIGCKAKDIIRFLQQRLKKA
aa 1330-1510- ROC : GTPase domain :
VPYNRMKLMIVGNTGSGKTTLLQQLMKTCKSDLGMQSATV/GIDVKDWPIQIRDKRKRDLVLNVWDFAGREEFYSTHP
HFMTQRALYLAVYDLSKGGAEVDAMKPWLFNIKARASSPVILVGTDLVSDKQRKACMSKITKELLNKRGFPAIRD
YHFVNATEESDALAKLRKTIINESLN
aa 1514-1872 : COR domain
FKIRDQLVVGQLIPDCYVELEKIILSERKNVPIEFPPVIDRKRLLQLVRENQLQLDENELPHAVHFLNESGVLLHFQDPAL
QLSDLYFVEPKWLCKIMAQILTVKVEGCPKHPKGIISRVDVEKFLSKKRKFKPKNYMSQYFKLLEKFQIALPIGEEYLLVP
SSLSDRHPVIELPHCENSEIIIRLYEMPYFPMGFWSRLINRLLLEISPYMLSGRERALRPNRMYPWRQGIYLNWSPEAYCL
VGSEVLDNHPESFLKITVPSCRKGCILLGQVVDHIDSLMEEWFPGLLEIDICGEGETLLKKWALYSFNDGEEHQKILLD
DLMKKAEEGDLLVNPQQPRLTIPISQIAPDLILADLPNIMLNN
aa 1873-2142: KIN domain
DELEFEQAPEFLLGDGSGFSVYRAAYEGEEVAVKIFNKHTSLRLLRQELVVLCHLHHPSLISLLAAGIRPRMLVMELAS
KGSLDRLLQQDKASLTRLTQHRIALHVADGLRYLHSAMIYRDLKPHNVLLFTLYPNAAIKIADYGIQAQYCCRMGIKT
SEGTPGFRAPEVARGNVIYNQQADVYSFGLLLYDILTTGGRIVEGLKFPNEFDELEIQGKLPDPVKEYGCAPWPMVEK
LIKQCLKENPQERPTSAQVFDILNSAELVCLTR
aa 2143-2527 :WD40 domain
RILLPKNVIVECMVATHHNSRNASIWLCGGHTDRGQLSFLDLNTEGYTSEEVADSRILCLALVHLPVEKESWIVSGTQS
GTLVINTEDGKKRHTLEKMTDSVTCLYCNSFSKQSKQKNFLLVGTADGKLAIFEDKTVKLGGAAPLKILNIGNVSTPLM
CLSESTNSTERNVMWGGCGTKIFSFSNDFTIQKLIETRTSOLFSAFSDSNITVWDTALYIAKQNSPVVEWVKKT
EKLCGLIDCVHFLREVMVKENKESKHKMSYSGRVKTLCLQKNTALWIGTGGHILLDLSTRRLIRVIYNFCNSVRVM
MTAQLGSLKNVMLVLGYNRKNTGQKQKEIQSCLTVWDINLPHEVQNLKHEVVKELAEKMRRTSVE
Tag HA : VDAYPYDVPDY

```

Figure 25: Séquence en acides aminés des constructions ΔLRRK2.

Le domaine ROC est représenté en rouge, le domaine COR en jaune, le domaine KIN en bleu et le domaine WD40 en orange. Le tag HA est représenté en vert. Sont soulignés, la sérine 1292 et la mutation G2019S.

Overexpression of the C-terminal fragment of LRRK2 harboring the G2019S substitution in substantia nigra dopaminergic neurons increases the neurotoxicity of mutant A53T α -synuclein *in vivo*

Noémie Cresto^{1,2}, Marie-Claude Gaillard^{1,2}, Charlène Josephine^{1,2}, Gwenaëlle Auregan^{1,2}, Géraldine Liot^{1,2}, Camille Gardier^{1,2}, Francesco Gubinelli^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Suéva Bernier^{1,2}, Caroline Jan^{1,2}, Pauline Gipchtein^{1,2}, Philippe Hantraye^{1,2}, Gilles Bonvento^{1,2}, Karine Cambon^{1,2}, Alexis-Pierre Bemelmans^{1,2}, Emmanuel Brouillet^{1,2} §

¹ CEA, DRF, Institut François Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRGen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

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

§, Correspondence: emmanuel.brouillet@cea.fr

Abstract

Alpha-synuclein (α -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 a marked increase of its kinase activity. Interplay between LRRK2 and α -syn may be involved in the neurodegeneration of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra (SNc) in PD. Here, we aimed at studying whether LRRK2^{G2019S} could increase the neurotoxicity induced by a mutant form of α -syn (A53T mutation) *in vivo* in DA neurons. We used a co-infection approach with AAV2/6 vectors encoding α -syn^{A53T}, and the C-terminal part of LRRK2 (Δ LRRK2) containing the kinase domain with either the G2019S mutation (Δ LRRK2^{G2019S}) alone or with the D1994A mutation (Δ LRRK2^{G2019S/D1994A}) that inactivates the kinase activity of LRRK2. AAVs were stereotaxically co-injected into the rat SNc and quantitative histological evaluation was performed at 6 and 15 weeks post-infection (PI). Results showed that 70% of SNc neurons co-expressed Δ LRRK2 and α -syn^{A53T} after infection. Co-expression of Δ LRRK2^{G2019S} and α -syn^{A53T} produced greater loss of DA neurons than that produced by α -syn^{A53T} alone. Δ LRRK2^{G2019S} alone produced no cell loss. We next investigated whether Δ LRRK2^{G2019S} increased the toxicity of α -syn^{A53T} through its kinase activity. To this purpose we investigated how the inactive form Δ LRRK2^{G2019S/D1994A} changed the toxicity of α -syn^{A53T}. Results showed that Δ LRRK2^{G2019S/D1994A} did not increase α -syn^{A53T} neurotoxicity. Thus, the present results support the hypothesis that LRRK2, through the catalytic activity of its kinase domain, facilitates α -syn toxicity *in vivo*.

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 (SNc) and the presence of neuronal aggregates (Lewy bodies) and dystrophic Lewy neurites containing the protein α -synuclein (α -syn) (Braak and Braak, 2000). There exists no treatment to delay neurodegeneration. The cause of α -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 α -syn protein and in LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) have been proved to associate with autosomal dominant (AD) PD (Lesage and 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 α -syn aggregation (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003). Compelling evidence indicate that α -syn is center stage 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 and 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).

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 α -syn has been suggested. Indeed LRRK2 toxicity may require the presence of α -syn and conversely, the presence of variants/mutant LRRK2 could increase the risk and/or impact on the α -synucleopathy in PD. Of importance, the level of kinase activity of LRRK2 could thus be a modifier of α -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 α -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^{G2019S} in these models, indicate that LRRK2 may increase α -syn toxicity (Daher et al., 2014, 2015; Lin et al., 2009).

However, the mechanisms underlying the “protoxic” effect of LRRK2 (especially the G2019S mutation) on α -syn toxicity are not known. Indeed, the exact role of the kinase domain is not totally demonstrated, although pharmacological interventions suggested that the kinase activity probably takes part in the synergy. 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 has not been ruled out. In addition, it is not known whether the potentiation of α -syn toxicity by the presence of LRRK2^{G2019S} is related solely to a cell-autonomous mechanism. Alternatively, LRRK2-expressing cells expressing 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*.

In the present study, in order to precisely address these questions in a relevant cellular context, we studied the effect of the C-terminal domain of LRRK2 harboring the G2019S mutation ($\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$) or its inactive form (mutations G2019S plus D1994A, named DK) $\Delta\text{LRRK2}^{\text{DK}}$ on the neurotoxicity of $\alpha\text{-syn}$ with the A53T mutation ($\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$) when overexpressed selectively in DA neurons in the substantia nigra (SNc) in adult rats. For this purpose, we performed experiments using AAVs allowing the expression of the different forms of ΔLRRK2 and $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$ alone or in combination in DA neurons. Quantitative histological evaluation showed that while $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ alone produced no loss of DA neurons, it could significantly increase $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$ -induced neurotoxicity. This effect was not seen with the inactive form $\Delta\text{LRRK2}^{\text{DK}}$.

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 iodixaniol density gradient followed by dialysis against PBSMK (0.5 mM MgCl₂ 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 ΔLRRK2 (WT, G2019S, and “kinase dead), α-syn A53T 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 ±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 µl of virus at a concentration of 2.5x10¹⁰ viral particles per site for single injection and in case of co-injection, 2.5x10¹⁰ vg of each vectors were injected for a total of 5x10¹⁰ viral particles per site, with a 34-gauge blunt-tipped needle linked to a 10 µl Hamilton syringe by a polyethylene catheter, at a rate of 0.25 µl/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 µm 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% H₂O₂ 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-α-synuclein, syn 211, 1:1000; anti-phospho-α-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, 6th edition). TH-positive cells were counted by unbiased stereology in the entire SNc 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 SNc.

The phosphorylation of the α -syn in S129 (P- α -syn^{S129}) was evaluated by counting using stereology methods the number of positive-neurons for P- α -syn^{S129} in the SNc. The SNc was delimited using the Nissl staining and grids (250 x 250 µm) were placed spaced by 100 x 100 µm. Quantification was performed on six serial sections spaced by 400 µm corresponding to the entire SNc. In the striatum, a threshold was applied to select only the positive-immunostaining for P- α -syn^{S129} 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% H₂O₂. 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 Δ LRRK2 and α -syn was determined by counting the number of cells co-expressing both Δ LRRK2 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 Δ LRRK2 and α -syn proteins were evaluated on three coronal sections in the substantia nigra. Twenty cells co-expressing both Δ LRRK2 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 Δ LRRK2 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- α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} toxicity

We investigated whether LRRK2 could increase the toxicity of α -syn in DA neurons through cell-autonomous mechanisms. For this reason we chose to use AAVs that allow selective expression in neuronal cells, produce efficient transduction of a large volume of brain tissue thanks to their good diffusion properties. In our previous work (Cresto et al. submitted), we showed that the C-terminal part of LRRK2^{G2019S} (Δ LRRK2^{G2019S}: 1330-2527 aa) retains, at least in part, the biochemical properties of full length LRRK2^{G2019S}, including dimerization and increased kinase activity in comparison to wild type fragment. In addition, we found that the overexpression of the C-terminal part of Δ LRRK2^{G2019S} with AAVs in the adult rat SNc produced partial (~30%) but significant loss of DA neurons at 25 weeks post-infection, whereas the overexpression of the wild type form of LRRK2 (Δ LRRK2^{WT}) was not toxic (Cresto et al. submitted). In the present study, we used a similar approach and, to optimize our Δ 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^{G2019S} 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).

Since we asked whether AAVs coding for different Δ LRRK2 constructs could increase the toxicity of AAV- α -syn^{A53T}, we search for an injection protocol leading to mild degeneration, in such a way that a potential “protoxic” effects of LRRK2 constructs could be easily detected. We conducted pilot experiments to determine the appropriate dose of AAV- α -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 15 weeks after the infection with AAV- α -syn^{A53T} post-injection (PI) (not shown).

Next, we studied the effects of AAV- Δ LRRK2^{G2019S}, AAV- Δ LRRK2^{WT} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S/D1994A} alone at this time point (15 weeks PI). Each AAV was injected unilaterally into the SNc (2.5 10¹⁰ 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 SNc (Fig. 1). 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 SNc did not differ significantly between the control group (PBS) and AAV- Δ LRRK2^{WT}, AAV- Δ LRRK2^{G2019S} or AAV- Δ LRRK2^{G2019S/D1994A}. Thus, these results suggested that these Δ LRRK2 fragments alone did not trigger neurodegeneration of DA neurons at 15 weeks PI.

Thus, these results indicated that the co-infection protocol with AAV- α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} and the evaluation of DA cell loss at 15 week PI were suitable to detect a potential synergy of toxicity between the two pathological transgenes.

Effects of co-infection with AAV- α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S}

We next asked with this co-infection paradigm (with 2.5×10^{10} particles for each vector) whether the presence of the different Δ LRRK2 fragments (wild type, G2019S and G2019S/D1994A) in DA neurons could modify the toxicity of α -syn^{A53T}.

We first studied the neurotoxic effects produced by AAV- α -syn^{A53T} in presence or absence of AAV- Δ LRRK2^{G2019S} at 15 weeks PI. We characterized the co-localization of α -syn^{A53T} and LRRK2 fragments in the SNc after co-infection, since we aimed at investigating the combined effects of α -syn^{A53T} and different LRRK2 fragments in neurons. Analysis using confocal microscopy showed that α -syn expression in the SNc was high in TH positive neurons (Fig. 2, A). In average, 70% of neurons co-expressed α -syn^{A53T} and LRRK2 fragments (Fig.2, B).

We evaluated the toxic effects of α -syn^{A53T} in presence or in absence of AAV- Δ LRRK2^{G2019S}. The AAV- α -syn^{A53T} alone produced a significant 38% loss of TH-positive cells as measured by unbiased stereology in the SNc at 15 week PI (mean count +/- SEM: Control, 12,344 +/- 734; AAV- α -syn^{A53T}, 7,555 +/- 527). The co-injection of AAV- α -syn^{A53T} with AAV-GFP (as a control of viral load) produced a loss of DA neurons similar to that obtained with AAV- α -syn^{A53T} alone (6,601 +/- 360). Of interest, the co-infection with AAV- α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} produced a significantly larger loss of DA neurons (Mean counts +/- SEM: 5,585 +/- 355) (Fig 3, A). In both α -syn^{A53T}/GFP and α -syn^{A53T}/ Δ LRRK2^{G2019S} groups, we evaluated the impact of SNc 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 SNc region. In comparison to the control group

(PBS), the TH immunoreactivity in the striatum was reduced by 15% in both α -syn^{A53T}/GFP and α -syn^{A53T}/ Δ LRRK2^{G2019S} groups. This small loss of α -syn^{A53T}-induced loss of TH-positive fibres was similar in the GFP and Δ LRRK2^{G2019S} groups (Fig. 4, C).

We also counted the number of SNc cells showing P- α -synS129 immunoreactivity in the different groups (Fig. 3, C). The number of P- α -synS129 –positive cells was significantly lower in the SNc co-infected with AAV- α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} than in the SNc of rats infected with AAV- α -syn^{A53T} alone or in combination with AAV-GFP (Fig. 3, D). The P- α -synS129 immunoreactivity was also evaluated in the striatum and, consistent with the results obtained in the SNc, we found lower levels of aggregated α -syn in the striatum of rats co-infected with AAV- α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} than in rats infected with AAV- α -syn^{A53T} / GFP (Fig. 3, E-F).

Differential effects of AAV- Δ LRRK2^{G2019S} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S/D1994A} on AAV- α -syn^{A53T} toxicity

We next investigated whether the effect of AAV- Δ LRRK2^{GS} on AAV- α -syn^{A53T}-induced toxicity was dependent on the kinase activity of the LRRK2 construct. To address this question, we compared the effects of Δ LRRK2^{G2019S} with those of the kinase dead form Δ LRRK2^{DK}. In these experiments, we chose an earlier time point PI (6 weeks).

We first compared the levels of transgene expression after infection with α -syn^{A53T} and AAV- Δ LRRK2^{G2019S} or AAV- Δ LRRK2^{DK}. Quantitative immunofluorescence analyses showed that almost the entire SNc was infected by the AAV- α -syn^{A53T} when co-infected with either AAV- Δ LRRK2^{GS} or AAV- Δ LRRK2^{DK} (Fig. 5). We also re-evaluated the co-localisation of LRRK2-related transgenes and α -syn^{A53T} (Fig. 6). Results showed that 76% of neurons expressed both proteins (Fig. 6, C), a results consistent with what we observed in the experiments described above (see Fig. 1). At higher magnification, we evaluated the level of fluorescence intensity corresponding to Δ LRRK2-HA staining. The results showed that Δ LRRK2^{GS} and Δ LRRK2^{DK} were expressed at the same level in SNc neurons (Fig. 6, C). In addition, we found that the α -syn^{A53T} protein was expressed at the same levels in neurons co-expressing Δ LRRK2^{GS} and Δ LRRK2^{DK} (Fig. 6, C).

We assessed the loss of DA neurons produced by AAV- α -syn^{A53T} when co-injected with either AAV- Δ LRRK2^{G2019S} or AAV- Δ LRRK2^{DK}. Results indicated that the loss of DA neurons induced by

α -syn^{A53T} was significantly lower in presence of Δ LRRK2^{DK} than that in presence of Δ LRRK2^{GS} (Fig. 7, A-B). The number of cells with P- α -synS129 immunoreactivity was similar in the Δ LRRK2^{DK} and Δ LRRK2^{G2019S} groups.

Finally, because of the role of neuroinflammation in neurodegeneration observed in α -syn^{A53T} models, we evaluated at this early time point the microglial status. Quantifications in the SNpc and in the striatum showed that, while α -syn^{A53T} produced microglial activation, Δ LRRK2^{G2019S} and Δ LRRK2^{DK} did not have any impact on the microglial activation induced by the α -syn mutated form.

Thus, these results indicated that the synergistic effect of Δ LRRK2^{GS} on the toxicity of α -syn^{A53T} towards DA neurons depends on its kinase activity.

Discussion

The mechanisms leading to degeneration of DA neurons in LRRK2 mutation gene carriers with PD are unknown. It is generally established that LRRK2^{G2019S} mutation leads to increased kinase activity and that this abnormally increased kinase activity would lead to cell death (Daher et al., 2014, 2015; Lin et al., 2009) (Greggio et al., 2006; Lee et al., 2010; Smith et al., 2006; West et al., 2007). In addition, a role of α -syn in LRRK2 mutation toxicity has been suggested (Daher et al., 2014, 2015; Lin et al., 2009). Indeed, neuropathological evaluation of the brain of PD patients with LRRK2 mutations shows the presence of bona fide LBs and Lewy neurite (Giasson et al., 2006). However, the role of the kinase in the crosstalk between LRRK2 and α -syn is controversial. In other words, how the kinase activity of LRRK2^{G2019S} mutation modulates α -syn neurotoxicity in the SNc is unknown.

In the present work, we used an AAV approach to selectively target SNc 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 α -syn^{A53T} in the rat SNc. In our experimental conditions, AAV- Δ LRRK2^{G2019S} alone did not produce loss of DA neurons and AAV- α -syn^{A53T} alone produced a partial loss of these cells. We found that the loss of DA cells produced by co-expression of Δ LRRK2^{G2019S} and α -syn^{A53T} was significantly higher than that measured in rats infected with AAV- α -syn^{A53T} alone or co-injected with a control vector (AAV-GFP). Conversely, overexpression of the inactive “kinase

dead" form $\Delta\text{LRRK2}^{\text{DK}}$ at cellular levels similar to those of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ did not change the toxicity of $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$. These novel findings are further in support of the hypothesis that the C-terminal domain of $\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ augments the toxic effects of $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$ through the catalytic activity of its kinase domain.

The histological evaluation we performed after infection of the SNc with AAV- $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$ and AAV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ showed that both transgenes were overexpressed in DA neurons. In both cases, approximately 70% of the SNc was infected. After co-infection, co-localization of both transgenes was found in a majority of neurons in the SNc. Neuropathological evaluation at 15 weeks PI after infection with AAV- $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$ 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, $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ lacks N-terminal domains that are known to play crucial roles in LRRK2 function. As discussed elsewhere (Cresto et al., submitted), biochemical characterization of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ and $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ 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. Thus, it is conceivable that overexpression of $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ compared to $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ leads to abnormal/increased phosphorylation of substrates, that at least in part are common with those of full length LRRK2 (Deng et al., 2008; Gloeckner et al., 2006; Greggio et al., 2008; Ito and Iwatsubo, 2012). This could produce in turn cellular alterations and eventually death of neurons. Supporting this hypothesis, we previously showed that overexpression of the $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ fragment using AAVs triggers neurodegeneration of DA neurons at six month post-infection while the $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ fragment, expressed at similar high levels, was devoid of obvious neurotoxicity (Cresto et al., submitted).

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 α -syn^{A53T} toxicity by the kinase activity of LRRK2 directly in the SNc (Melrose et al., 2010; Ramonet et al., 2011). We could directly investigate whether a functional interaction could exist between AAV- α -syn^{A53T} and Δ LRRK2^{G2019S} in DA neurons. Our results show the existence of this interaction, since overexpression of Δ LRRK2^{G2019S} significantly enhanced α -syn^{A53T} neurotoxic effects in rat SNc. Using transgenic animals, Lin and collaborators showed that the overexpression of LRRK2 (wild type or G2019S mutation) in forebrain neurons (striatum and cerebral cortex) increased the toxicity of α -syn^{A53T} (Lin et al., 2009). In these double transgenic mice, significant degeneration of the striatum and cortex, and enhanced accumulation of α -syn aggregates were found. For technical reasons pathological transgenes were not expressed in the SNc and no degeneration of DA was detected in these models. Probably, the CamKII α promoter used to drive the expression of the tetracycline transactivator (tTA) that activates the TetO promoter of LRRK2 and α -syn^{A53T} transgenes in these mice is not active in SNc DA neurons, since endogenous expression of CamKII α in neurons of the SNc is low compared to that seen in forebrain neurons. In LRRK2 knockout rats, the toxicity produced by AAV coding for α -syn is lower than that in wild type rats (Daher et al., 2015). Using crossbreeding of other transgenic models in which promoters driving LRRK2^{G2019S} and α -syn^{A53T} 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 α -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 Δ LRRK2^{G2019S} and α -syn^{A53T} did not lead to more microglial activation than the expression of α -syn^{A53T} alone. Thus our results indicate that the synergy between LRRK2 and α -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 α -syn when mutant LRRK2 is expressed in neurons and glial cells. For example, it has been recently shown that seeding of α -syn aggregates by exposure of neurons to α -syn fibrils is increased in neurons expressing mutant LRRK2 (Volpicelli-Daley et al., 2016). The levels of LRRK2 activity in microglial cells may also

regulate protoxic phenomenon associated with α -syn induced neuroinflammation (Daher et al., 2014; Maekawa et al., 2016; Russo et al., 2014).

The neuronal mechanisms underlying the synergy between LRRK2 and α -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^{G2019S} 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^{G2019S} have been developed and extensively characterized. These models display no (or very limited) degeneration of DA cells in the SNc. In fact, there exist no transgenic models which express very high levels of LRRK2^{G2019S} in the SNc. The apparent lack of toxicity of LRRK2^{G2019S} in the SNc 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 demonstrate that higher the expression of LRRK2^{G2019S}, more severe the resulting toxicity. There exist rare evidence obtained *in vivo* that show a relationship between the increase kinase activity of LRRK2^{G2019S} 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- Δ LRRK2^{G2019S} (Cresto et al., submitted), the overexpression of LRRK2^{G2019S} (or Δ LRRK2^{G2019S}) in the SNc was found to produce 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 α -syn and LRRK2 toxicity. It was shown that neuroinflammation and neurodegeneration produced by the infection of the SNc with AAV- α -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- α -synuclein in the SNc was higher in transgenic LRRK2^{G2019S} rats than in wild-type rats. Interestingly, in both genotypes, the treatment with the LRRK2 inhibitor PF-06447475 (PF) reduced the toxicity of α -syn (Daher et al., 2015). This suggested that the exacerbation of α -syn toxicity by LRRK2^{G2019S} 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 α -syn/ LRRK2^{G2019S} 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 Δ LRRK2^{G2019S} increased the toxicity of AAV- α -syn^{A53T} towards DA neurons, the overexpression of the inactive protein Δ LRRK2^{G2019S/D1994S} produced no change towards the toxicity AAV- α -syn^{A53T}. In our experiments, we could check that the difference between the toxicity of Δ LRRK2^{G2019S} and that of Δ LRRK2^{DK} 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 Δ LRRK2^{WT} and Δ LRRK2^{G2019S} mainly resides in their different kinase activities.

In conclusion the present study suggests that the presence of LRRK2^{G2019S} can potentiate the toxicity of α -syn^{A53T} 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 α -syn.

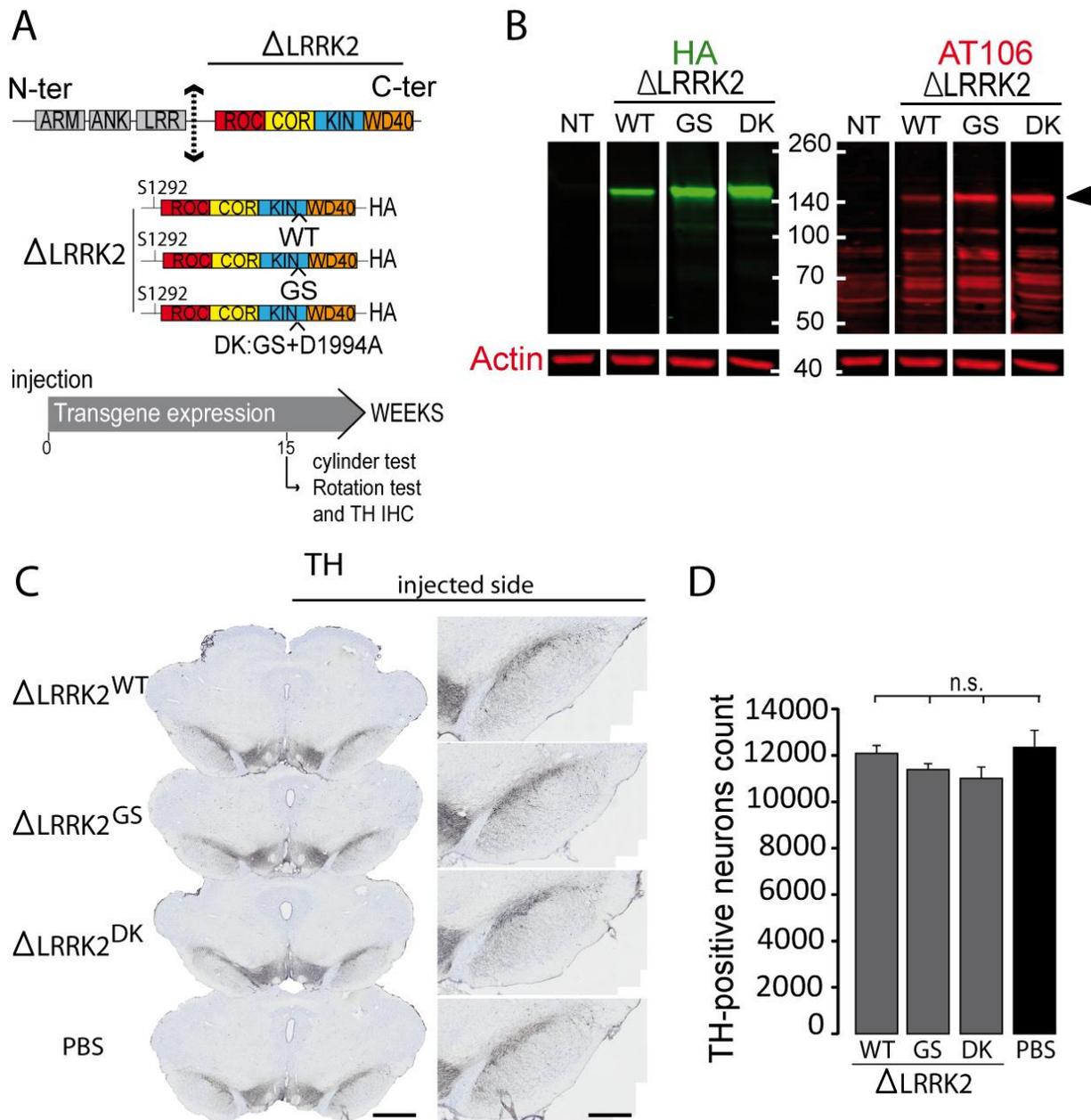


Figure 1: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH). (A) The C-terminal fragment of LRRK2 called Δ LRRK2 was generated in different forms, WT, G2019S or dead kinase form (DK). (B) Biochemical analysis of cells transfected with these Δ LRRK2 showed that all three fragments were expressed at similar levels (C-D) These fragments were cloned into an AAV and unilaterally injected in the rat SNc. 15 weeks post-injection, TH immunohistochemistry was performed. The number of TH-positive neurons was evaluated by stereology, no obvious toxicity of the LRRK2 fragments at 15 weeks post-infection. Scale bar: 750 μ m, 400 μ m. n=10 animal/group.

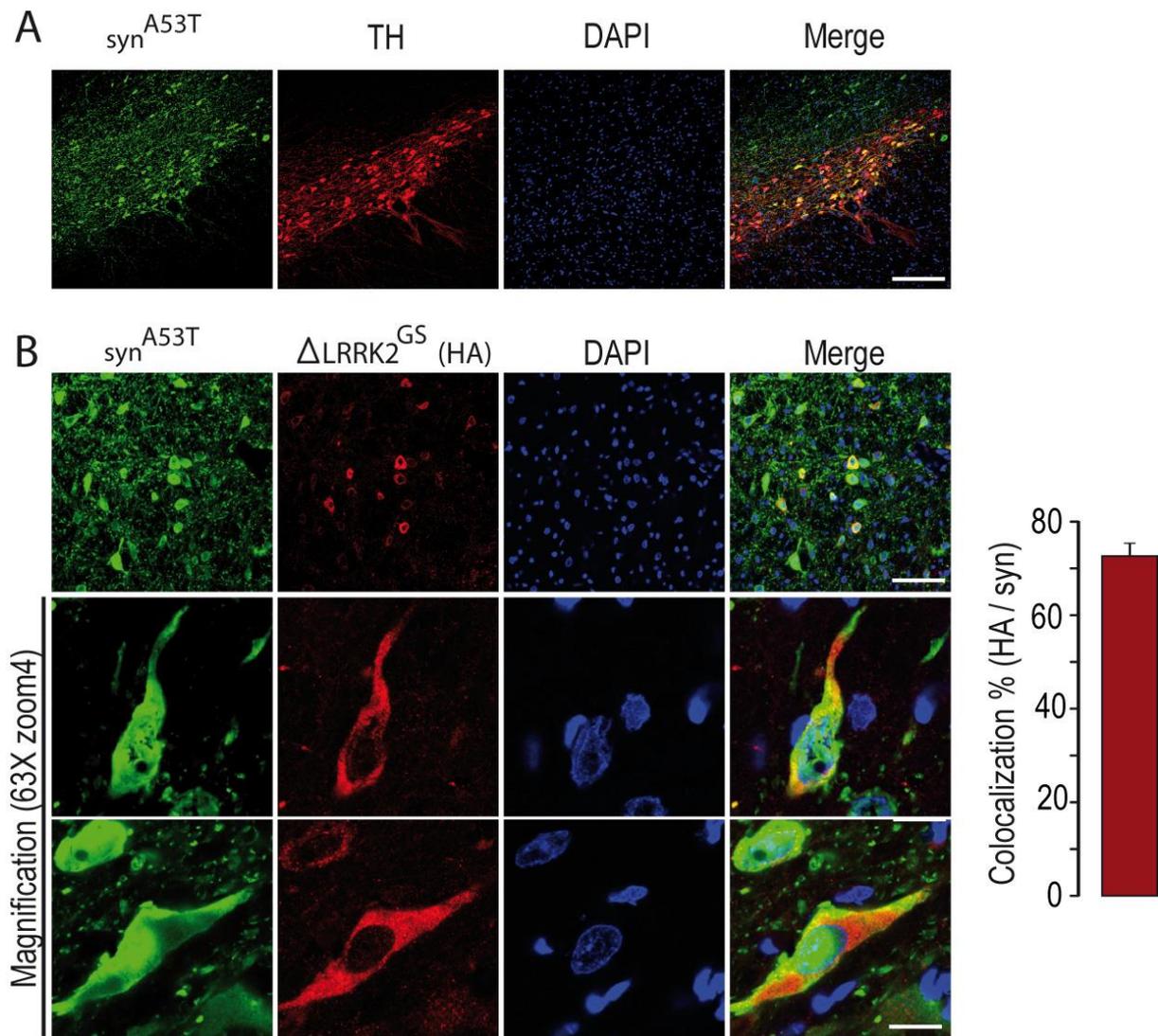


Figure 2: Histological evaluation of transgenes expression in the SNpc at 15 weeks post-infection. (A) The transduction of α -syn (in green) was evaluated in the SNpc, TH staining, in red. Scale bar: 500 μ m. (B) The number of neurons expressing both α -syn and $\Delta LRRK2^{GS}$ was measured, higher magnification showed the cytoplasm localization of $\Delta LRRK2^{GS}$. Scale bar 40X: 60 μ m , 63X zoom 4: 10 μ m.

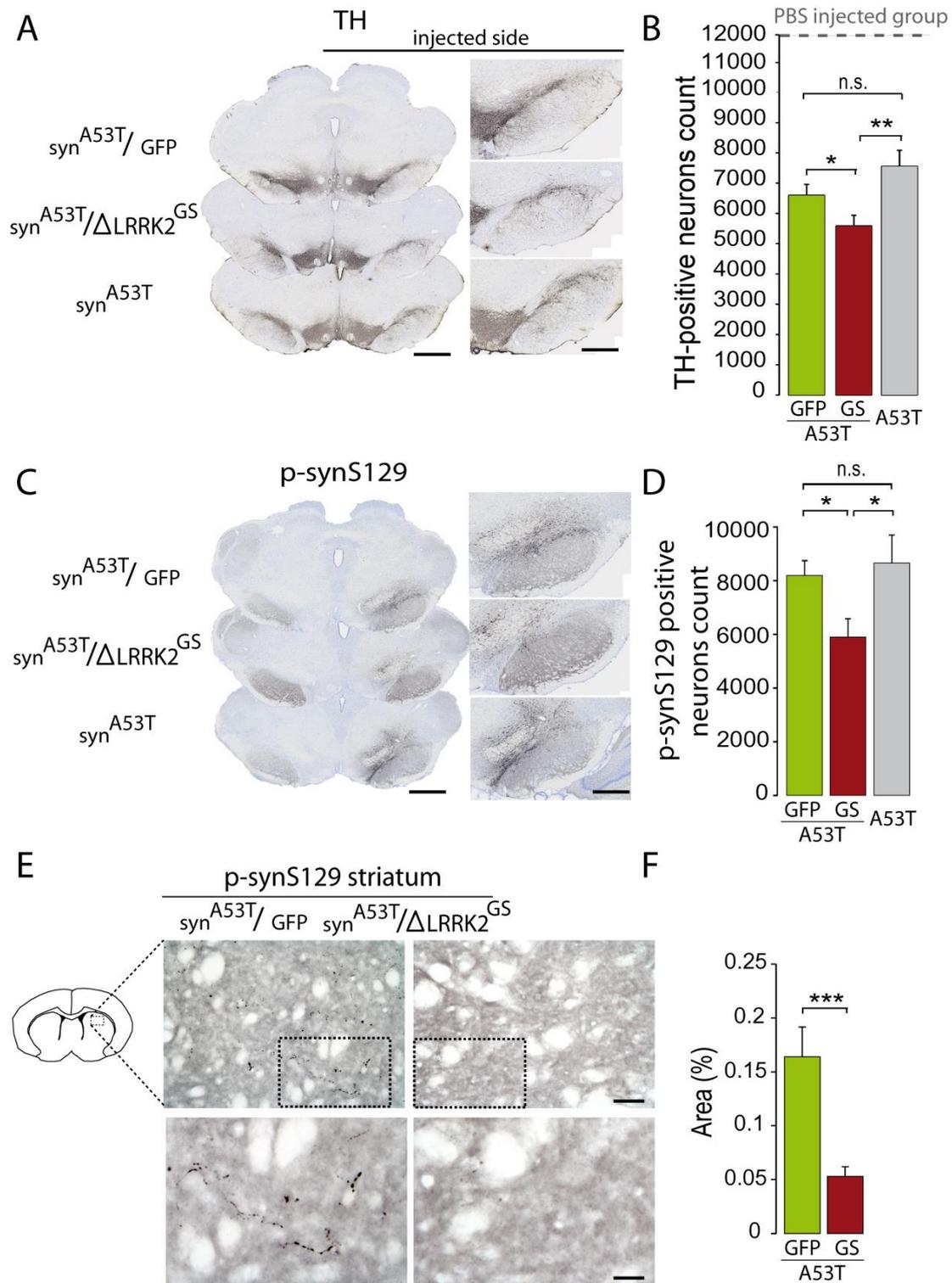


Figure 3: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH) and phospho- α -synS129 aggregates at 15 weeks post-infection. (A-D) The numbers of TH-positive and P- α -synS129-positive neurons were evaluated by stereology in the SNpc. Scale bar: 750 μ m, 400 μ m **(E-F)** The percentage of area occupied by the P- α -synS129-positive staining was measured in the striatum at 15 weeks PI. n=10 animal/group. Scale bar: 200 μ m, 50 μ m.

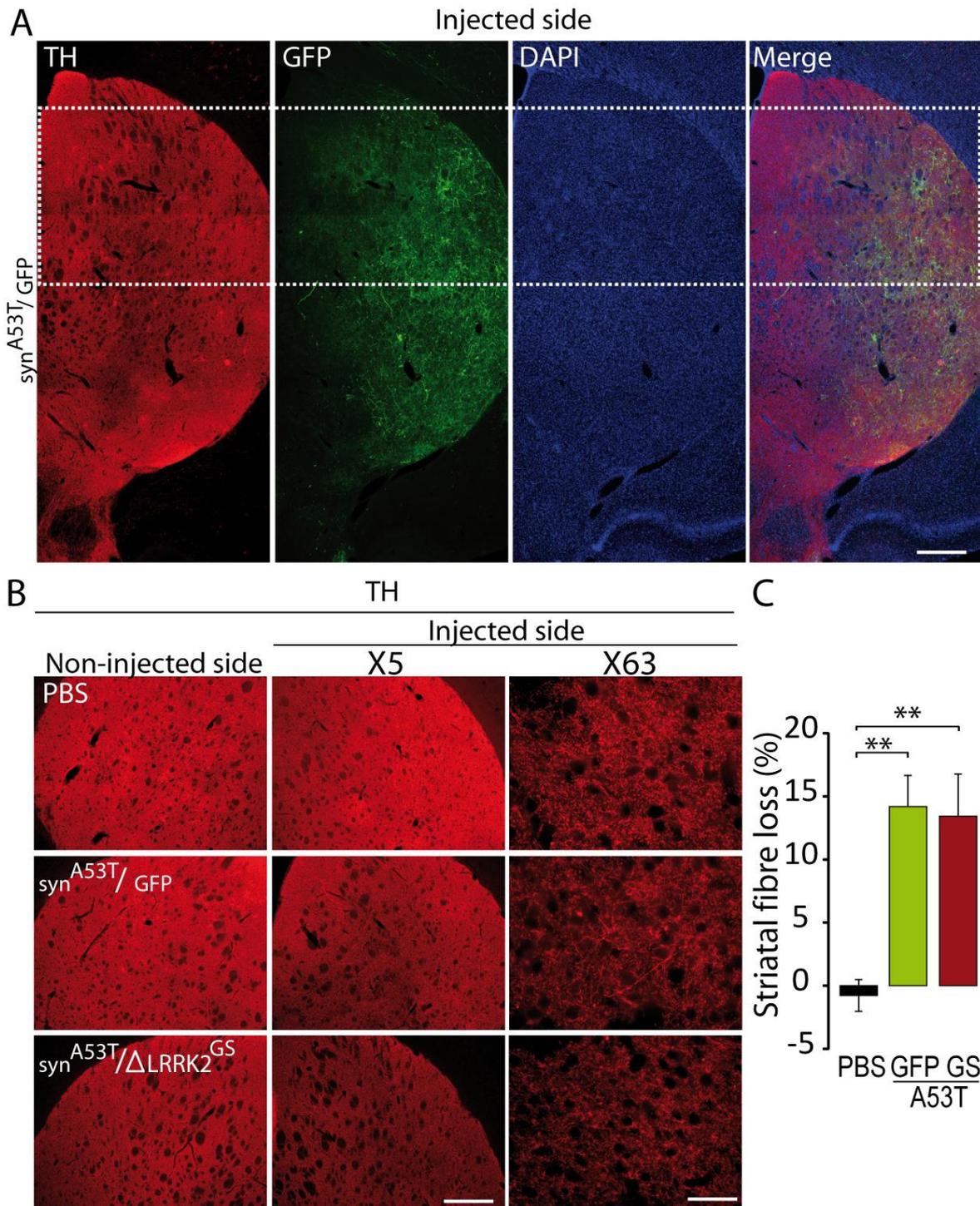


Figure 4: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH). (A) Striatal fiber loss was evaluated in the dorso-medial striatum using TH-immunofluorescence. Scale bar: 1000µm. (B-C) The mean grey value was quantified at the magnification X5. (A-B) scale bar: 1000µm. (B-C) scale bar: 100µm. n=10 animal/group.

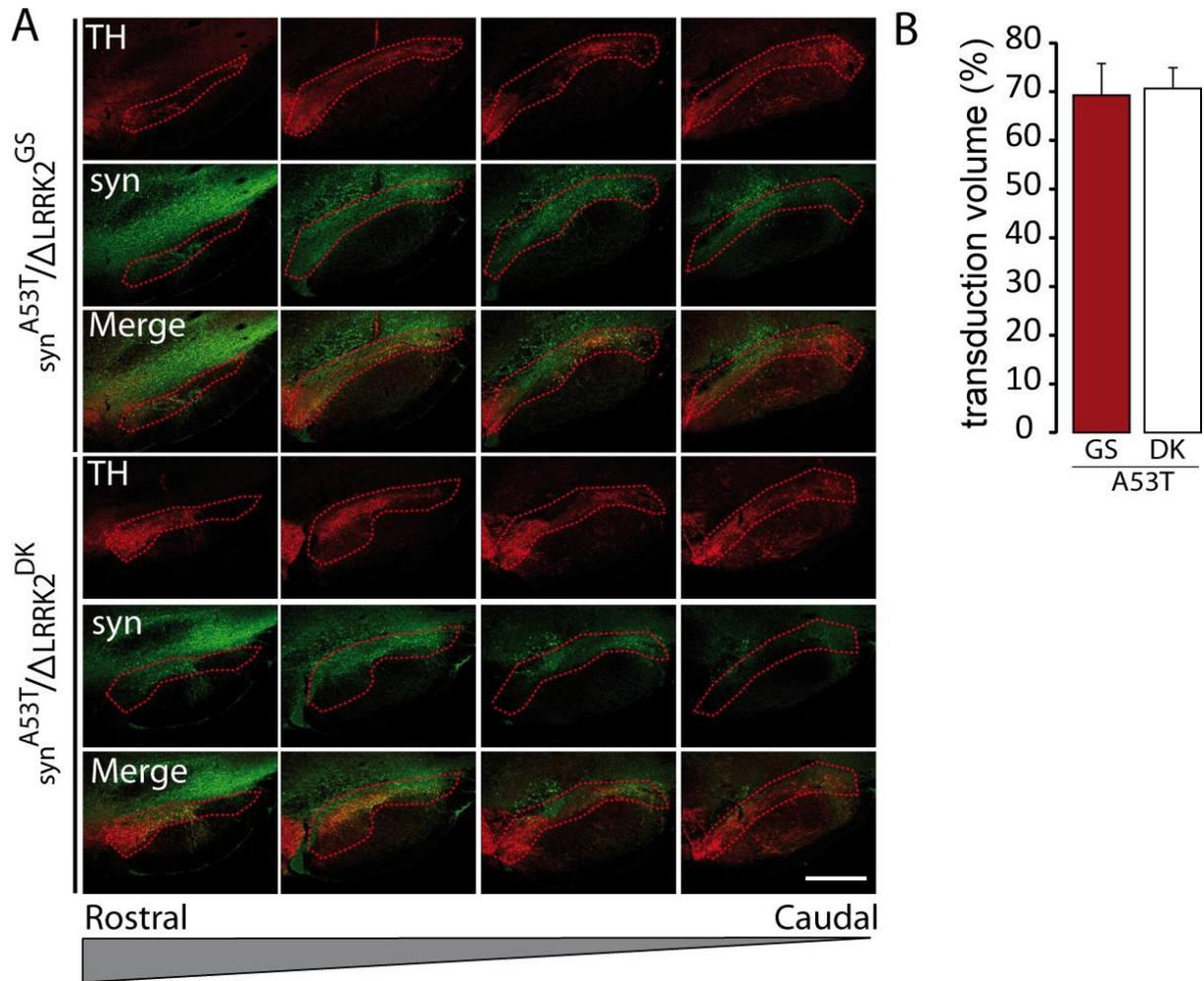


Figure 5: transduction volume measurement. (A) The delineation of the SNpc based on the TH staining (in red) was reported on the green channel corresponding to the α -syn protein. Scale bar: 1000 μ m. **(B)** The quantification was done on the entire SNpc. n=8 animal/group.

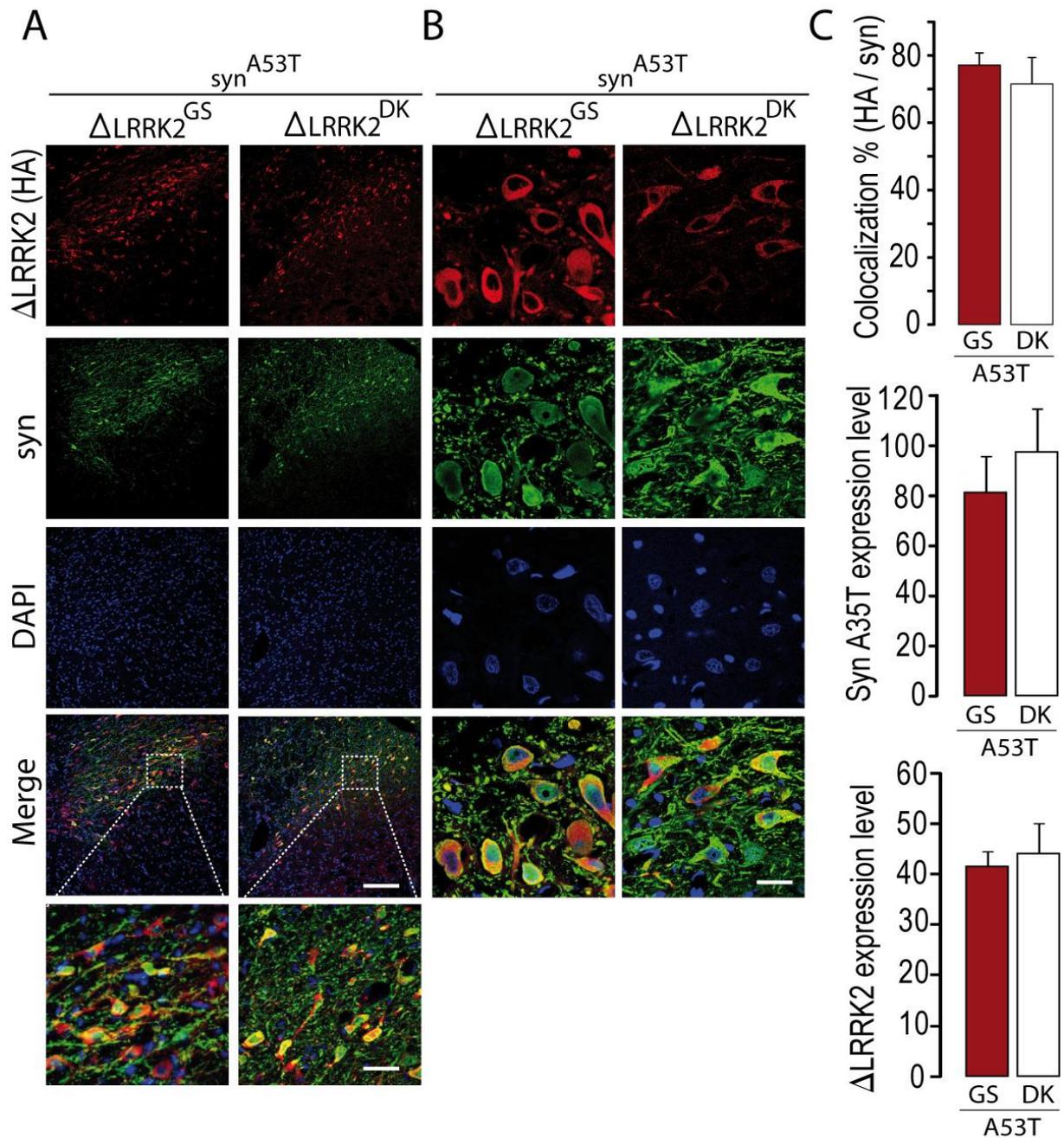


Figure 6: Colocalization and expression level. (A-B) At low and high-magnification, double immunofluorescence, $\Delta LRRK2$ and α -syn, showed that the majority of cells co-expressed both transgenes at similar levels. Scale bar: 200 μm , magnifications: 50 μm , 10 μm . **(C)** The percentage of colocalization, and protein expression levels (mean grey fluorescence) were quantified in the different groups. n=8 animal/group.

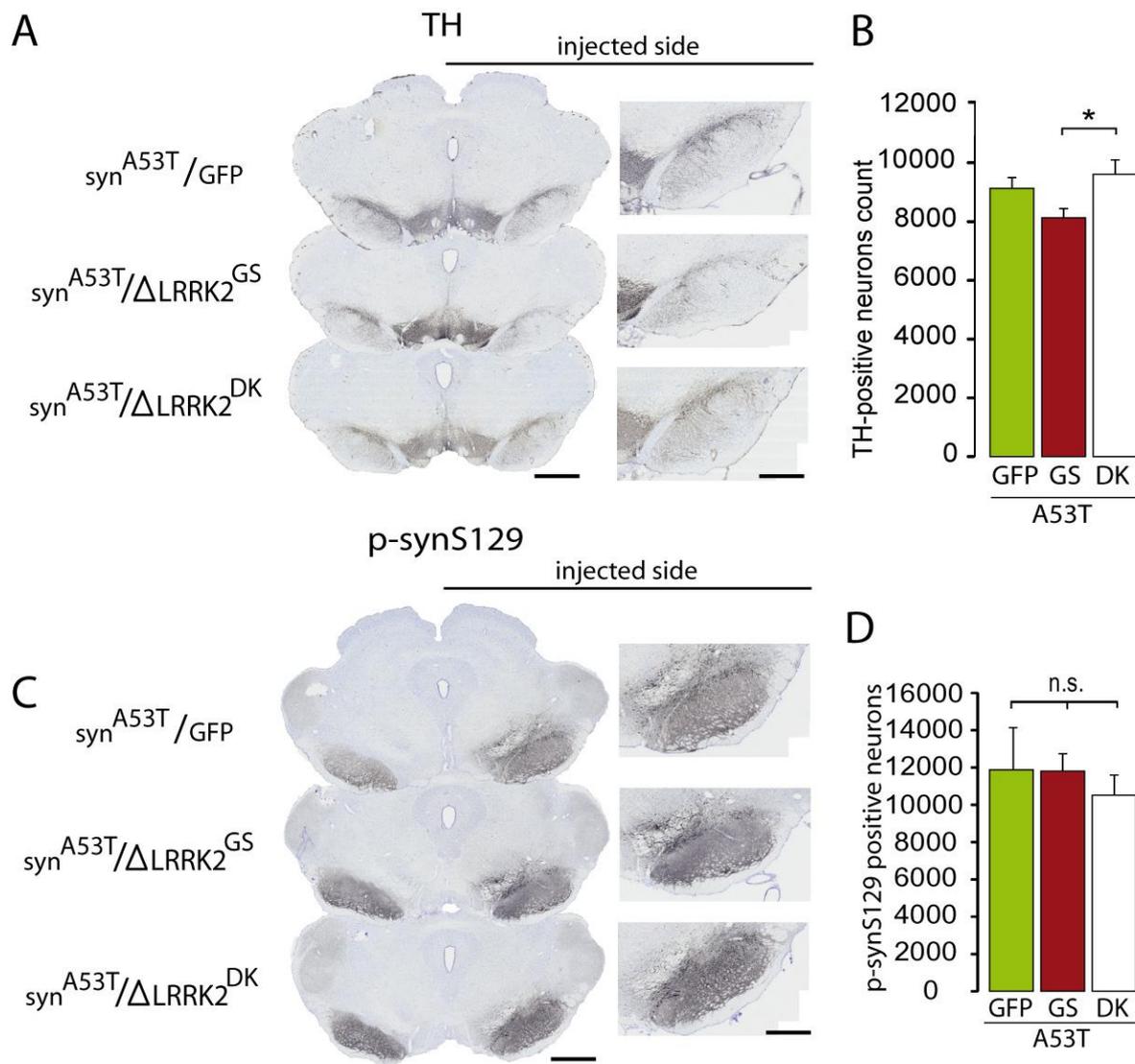


Figure 7: Immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase (TH) and phospho- α -synS129 aggregates at 6 weeks post-infection. (A-D) The numbers of TH-positive and P- α -synS129-positive neurons were evaluated by stereology in the SNpc. n=10 animal/group. Scale bar: 750 μ m, 400 μ m

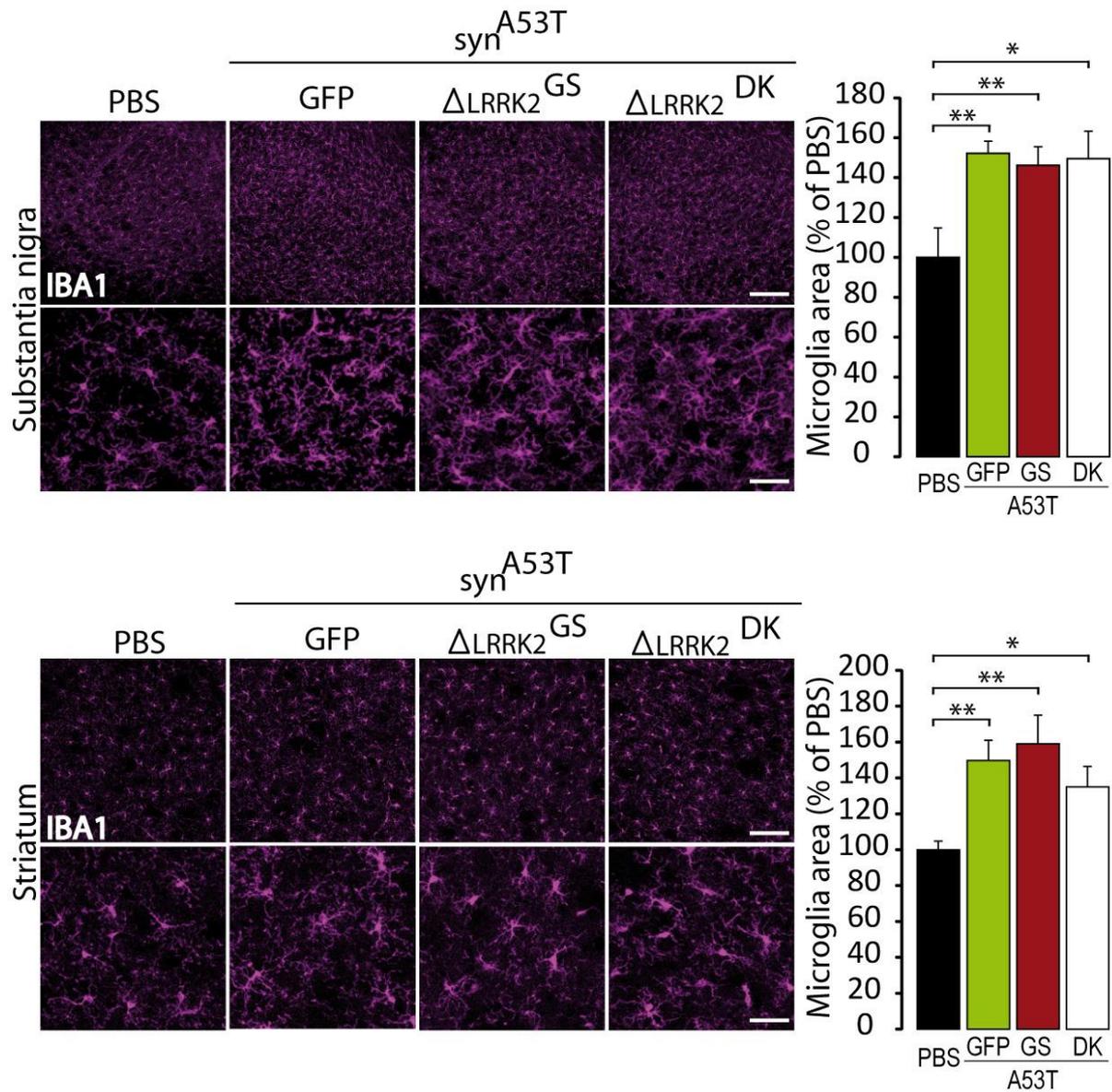


Figure 8: Microglial activation. (A-B) The microglial activation (microglia area) was evaluated based on the IBA1 staining in the SNpc and in the striatum (C-D). Results were expressed as percentage of control group (PBS). n=8 animal/group. Scale bar: 200 μm , magnifications: 50 μm .

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). 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, 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.

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.

Biskup, S., and West, A.B. (2009). Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson’s disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1792*, 625–633.

Braak, H., and Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson’s disease. *J. Neurol.* *247*, II3-II10.

Brockmann, K., Gröger, A., Di Santo, A., Liepelt, I., Schulte, C., Klose, U., Maetzler, W., Hauser, A.-K., Hilker, R., Gomez-Mancilla, B., et al. (2011). Clinical and brain imaging characteristics in leucine-rich repeat kinase 2-associated PD and asymptomatic mutation carriers. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *26*, 2335–2342.

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 Lond. Engl.* *364*, 1167–1169.

Cresto, N., Marie-Claude Gaillard, Diguët, E., Bellet, D., Legroux, L., Francelle, L., Mitja, J., Auregan, G., Joséphine, C., Dufour, N., et al. (submitted). Neuron selective overexpression of the C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation produced neurodegeneration of the substantia nigra.

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 α -synuclein transgenic mouse model are independent of LRRK2. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2420–2431.

Daher, J.P.L., Volpicelli-Daley, L.A., Blackburn, J.P., Moehle, M.S., and West, A.B. (2014). Abrogation of α -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 9289–9294.

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 α -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* *290*, 19433–19444.

Deng, J., Lewis, P.A., Greggio, E., Sluch, E., Beilina, A., and Cookson, M.R. (2008). Structure of the ROC domain from the Parkinson’s disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1499–1504.

- 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.
- Giasson, B.I., Covy, J.P., Bonini, N.M., Hurtig, H.I., Farrer, M.J., Trojanowski, J.Q., and Van Deerlin, V.M. (2006). Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann. Neurol.* *59*, 315–322.
- 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.
- Gloeckner, C.J., Kinkl, N., Schumacher, A., Braun, R.J., O'Neill, E., Meitinger, T., Kolch, W., Prokisch, H., and Ueffing, M. (2006). The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 223–232.
- 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.
- Greggio, E., Zambrano, I., Kaganovich, A., Beilina, A., Taymans, J.-M., Daniëls, V., Lewis, P., Jain, S., Ding, J., Syed, A., et al. (2008). The Parkinson Disease-associated Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* *283*, 16906–16914.
- 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.
- Ito, G., and Iwatsubo, T. (2012). Re-examination of the dimerization state of leucine-rich repeat kinase 2: predominance of the monomeric form. *Biochem. J.* *441*, 987–998.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., and Riess, O. (1998). AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* *18*, 106–108.
- 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.
- Lesage, S., and Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R48–R59.
- 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.
- 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.
- Maekawa, T., Sasaoka, T., Azuma, S., Ichikawa, T., Melrose, H.L., Farrer, M.J., and Obata, F. (2016). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) regulates α -synuclein clearance in microglia. *BMC Neurosci.* *17*, 77.
- Melrose, H.L., Dächsel, J.C., Behrouz, B., Lincoln, S.J., Yue, M., Hinkle, K.M., Kent, C., Korvatska, E., Taylor, J.P., Witten, L., et al. (2010). Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* *40*, 503–517.
- Oosterveld, L.P., Allen, J.C., Ng, E.Y.L., Seah, S.-H., Tay, K.-Y., Au, W.-L., Tan, E.-K., and Tan, L.C.S. (2015). Greater motor progression in patients with Parkinson disease who carry LRRK2 risk variants. *Neurology* *85*, 1039–1042.

- 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.
- 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 α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276, 2045–2047.
- 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.
- Rosenbusch, K.E., and Kortholt, A. (2016). Activation Mechanism of LRRK2 and Its Cellular Functions in Parkinson's Disease. *Park. Dis.* 2016, 7351985.
- Russo, I., Bubacco, L., and Greggio, E. (2014). LRRK2 and neuroinflammation: partners in crime in Parkinson's disease? *J. Neuroinflammation* 11, 52.
- Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N.N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., Arai, T., Nagura, H., Yamanouchi, H., Hasegawa, M., et al. (2003). Accumulation of Phosphorylated α -Synuclein in Aging Human Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 644–654.
- Sheng, Z., Zhang, S., Bustos, D., Kleinheinz, T., Pichon, C.E.L., 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). α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- 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.
- Volpicelli-Daley, L.A., Abdelmotilib, H., Liu, Z., Stoyka, L., Daher, J.P.L., Milnerwood, A.J., Unni, V.K., Hirst, W.D., Yue, Z., Zhao, H.T., et al. (2016). G2019S-LRRK2 Expression Augments α -Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons. *J. Neurosci.* 36, 7415–7427.
- 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.
- Yahalom, G., Orlev, Y., Cohen, O.S., Kozlova, E., Friedman, E., Inzelberg, R., and Hassin-Baer, S. (2014). Motor progression of Parkinson's disease with the leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutation: Disease progression in PD with G2019S mutation. *Mov. Disord.* 29, 1057–1060.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., et al. (2004). Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 44, 601–607.

8 DISCUSSION GÉNÉRALE

8.1 PERTINENCE DE L'UTILISATION DU FRAGMENT Δ LRRK2

8.1.1 ACTIVITE BIOCHIMIQUE DE Δ LRRK2

Par des essais biochimiques *in vitro*, nous avons validé que les fragments de LRRK2 utilisés dans nos études pouvaient se comporter, du moins en partie, comme la forme entière de LRRK2. Des expériences visant à tester l'activité d'autophosphorylation de LRRK2 ainsi que des tests kinases ont montré une augmentation nette de l'activité catalytique de la forme G2019S par rapport à la forme sauvage. En d'autres termes, ces résultats indiquent que la mutation G2019S au sein de Δ LRRK2 induit un changement conformationnel et fonctionnel similaire à celui qui a lieu dans la protéine entière. Par ailleurs, les analyses en gels non dénaturants d'extraits protéiques de cellules sur-exprimant Δ LRRK2 indiquent la présence majoritaire d'espèces moléculaires migrant au double du poids moléculaire attendu de Δ LRRK2, indiquant que Δ LRRK2 se dimérise, comme attendu pour la protéine entière. Ainsi, Δ LRRK2 semble posséder des propriétés biochimiques proches de celles de la protéine entière.

Les fragments de LRRK2 étudiés, démunis de la partie N-terminale, ne sont certainement pas capables de reproduire tous les aspects complexes de la biologie de la protéine LRRK2 entière et notamment l'interaction avec ses partenaires médiée par la partie N-terminale. Les résultats obtenus indiquent néanmoins que Δ LRRK2 permet de mimer une augmentation d'activité kinase de LRRK2, et probablement une augmentation de phosphorylation d'une partie de ses substrats, phénomène qui pourrait avoir des effets neurotoxique pour les neurones.

Cependant, il serait nécessaire d'étudier plus en détail si la surexpression de Δ LRRK2^{GS} conduit bien à l'augmentation de la phosphorylation de ses substrats *in vivo* (tel que les protéines Erzine Radixine Moesine (ERM), et Rab7 par exemple).

8.1.2 ACTIVITE BIOLOGIQUE

En parallèle, nous avons testé l'activité « biologique » de Δ LRRK2 *in vivo*, par injection des LV codant pour Δ LRRK2 sauvage, mutée G2019S ou une forme « kinase dead » (DK) dans le

striatum en vue de réaliser une analyse transcriptomique de plus de 80 gènes striataux. Les résultats (présentés dans l'annexe à l'article 1, 11.1.1) montrent que $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ induit des changements des niveaux d'expression de gènes codant pour des protéines en relation avec la signalisation cellulaire et la transmission synaptique (Grin2a, Raph3a, Snap25, Cnr1, Tac1, Hpc4, et Rgs4). Ces observations sont cohérentes avec le rôle possible de LRRK2 dans la régulation des mécanismes synaptiques (endocytose/exocytose) (Parisiadou et al., 2014; Piccoli et al., 2011). Ces effets sont dépendants de l'accroissement de l'activité kinase de $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$, car ils n'apparaissent pas avec la forme WT et la forme DK. De manière surprenante, ces effets sont observés en absence d'effet sur des acteurs clés de l'apoptose (Bax, Akt, Casp3).

Il serait intéressant de conduire à l'avenir une étude transcriptomique sur les neurones dopaminergiques transduits, comme nous l'avons fait dans le striatum. Ces analyses pourraient révéler certaines cibles cellulaires de la mutation G2019S.

8.2 LA TOXICITE NEURONALE DU FRAGMENT ΔLRRK2

8.2.1 LA DIFFERENCE ENTRE LES VECTEURS

Nous avons montré dans ce travail *in vivo* que l'expression purement neuronale de $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ par utilisation de vecteurs LV ne conduit pas à la mort des neurones de la SNc, et ceci même après un temps relativement long de 25 semaines post-injection. Les LV ne transduisent pas l'intégralité de la SNc mais permettent localement de transduire une grande quantité de neurones. De plus, ce sont des vecteurs qui permettent une expression stable dans le temps, compatible avec des expériences de longue durée. Bien que nos études histologiques n'aient pu mettre en évidence de perte neuronale, il est possible que la surexpression de $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ ait un impact sub-toxique sur les neurones dopaminergique transduits, comme le suggèrent nos résultats de transcriptomique dans le striatum.

Suite à ces études utilisant les lentivirus, nous avons envisagé que le niveau de transduction relativement faible (par rapport aux AAVs) pouvait expliquer l'absence de toxicité dans le délai post-infection étudié. Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas pu étudier des délais post-infection de 12 ou 18 mois pendant cette thèse, bien que le facteur temps soit un élément important dans la mise en place de processus dégénératifs. Nous avons donc posé

l'hypothèse qu'un accroissement de l'expression par l'utilisation d'AAV pourrait conduire à une toxicité détectable. Contrairement aux LV, l'injection de vecteurs AAV conduit à la transduction quasiment complète de la SNc (plus de 70% de la SNc) avec un niveau d'expression environ dix fois supérieur aux LV. Les vecteurs AAV codant pour $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ et $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ ont été injectés dans la SNc et l'effet sur la mort neuronale a été analysé six mois après l'injection comme pour les LV. Contrairement aux résultats obtenus avec les LV, l'injection de $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ conduit à une dégénérescence partielle (~35%) mais significative des neurones dopaminergiques de la SNc qui n'est pas observée dans les groupes injectés avec $\Delta\text{LRRK2}^{\text{WT}}$ ou le véhicule des vecteurs (PBS) six mois après injection. La différence de toxicité des LV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ et des AAV- $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ peut probablement s'expliquer par les différences des niveaux cellulaires d'expression après l'infection. Ces différences d'expression sont probablement liées à la différence d'efficacité de transduction entre les deux types de vecteurs. En effet, dans les deux cas les transgènes (mPGK) et les promoteurs sont similaires. Ses résultats suggèrent qu'outre la présence de la mutation, le niveau d'expression de ΔLRRK2 serait déterminant pour induire une toxicité vis-à-vis des neurones dopaminergiques *in vivo*. Nos observations sont cohérentes avec le fait que les modèles murins transgéniques où l'expression de LRRK2 est faible (Melrose et al., 2010; Ramonet et al., 2011; Xiong et al., 2017), ne montrent pas de perte cellulaire, alors que les modèles sur-exprimant $\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ à l'aide d'HSV et d'adénovirus présentent une perte cellulaire significative (Dusonchet et al., 2011; Lee et al., 2010a). De plus nos résultats sont aussi en accord avec ceux obtenus récemment à l'aide de cultures primaires de neurones transfectés suggérant que le niveau d'expression de LRRK2 est un facteur important dans le déclenchement de la toxicité cellulaire (Skibinski et al., 2014).

Nous avons vu que l'expression de $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ est majoritairement (voire uniquement) neuronale, ce qui permet d'étudier la toxicité découlant de l'augmentation d'activité kinase de manière plus précise comparé aux modèles HSV et Adénovirus, pour lesquels la surexpression de LRRK2 se produit dans différents types cellulaires (neurones striataux et cellules gliales). Cet aspect pourrait être un avantage considérable pour étudier relativement simplement *in vivo*, dans un contexte cellulaire pertinent de la MP, l'impact de produits de gènes (protéines ou d'ARN) modulateurs de la toxicité de $\Delta\text{LRRK2}^{\text{G2019S}}$ dans l'optique de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Il serait intéressant de pouvoir évaluer dans le détail, *in vivo* via les vecteurs AAV ou *in vitro* via les lentivirus sur neurones en culture, la relation entre niveau d'expression et toxicité, en réalisant une gamme croissante de vecteur, afin d'augmenter la quantité de protéine exprimées.

8.2.2 INTERACTION Δ LRRK2 ET A-SYNUCLEINE

Les données de la littérature concernant l'interaction entre LRRK2 et l' α -synucléine ne sont pas totalement congruentes. Dans une première étude, les souris transgéniques générées exprimant les formes humaines de LRRK2 mutée G2019S et de l' α -synucléine mutée A53T sous le contrôle du promoteur CaMKII (promoteur contrôlant l'expression de la protéine tTA qui active le promoteur TeTO en amont des transgènes LRRK2 et l' α -synucléine) présentent une légère tendance à une mort cellulaire augmentée dans le striatum et le cortex comparée aux souris exprimant la forme WT de LRRK2 (Lin et al., 2009a). Cependant, les neurones dopaminergiques de la SNc ne sont pas touchés dans ces modèles, possiblement du au faite que l'expression contrôlée par le promoteur CAMKII ne permet pas de surexpression dans la substance noire. En revanche dans une autre étude la co-expression des deux formes mutées ne semble pas induire de changement de la mort neuronale (Daher et al., 2012). Du fait de l'expression protéique parfois non concordante entre LRRK2 et l' α -synucléine (transgènes exprimés dans des régions du cerveau différents, promoteurs différents,...), les modèles de co-expression par croisement de souris transgéniques ne semblent pas adéquats pour répondre à la question de l'interaction entre LRRK2 et l' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques de la SNc. D'autres stratégies ont été envisagées, et notamment, une étude publiée pendant nos travaux a évalué l'effet de l'injection de vecteurs AAV codant pour l' α -synucléine sauvage dans un modèle transgénique rat sur-exprimant LRRK2 muté G2019S (rat BAC LRRK2 G2019S) (Daher et al., 2015). Les analyses réalisées quatre semaines après injection d'AAV-human- α -syn montrent que le nombre de neurones DA est significativement diminué chez les rats exprimant la forme mutée G2019S comparé aux rats sauvages. De plus, les rat déficients pour LRRK2 semblent être protégés contre la toxicité induite par l'injection d'AAV codant pour l' α -synucléine (Daher et al., 2014). Ces modèles semblent plus pertinents que les modèles de croisement de souris transgéniques et confirment qu'il existe bien une synergie entre LRRK2 et l' α -synucléine mais ne répondent pas à la question du rôle spécifique de l'interaction des deux protéines dans les neurones DA

de la SNc, qui sont vulnérables dans la MP. Dans le modèle rat montrant une synergie entre LRRK2^{G2019S} et l' α -synucléine (Daher et al., 2015), LRRK2 est exprimé aussi bien dans les neurones que dans la microglie ou les astrocytes.

Dans les expériences relatives à l'article 2, nous avons pris avantage du modèle AAV- Δ LRRK2 (article 1) et du modèle rat AAV- α -syn^{A53T} développés par de nombreux laboratoires depuis plusieurs années ((Dehay and Fernagut, 2016; Lo Bianco et al., 2002; Schneider et al., 2008). Pour nos études, nous avons développé un AAV- α -syn^{A53T} sous promoteur PGK, déjà utilisé pour contrôler l'expression des constructions Δ LRRK2. Les AAV- Δ LRRK2 et les AAV- α -syn^{A53T} ont été co-injectés dans la SNc et les effets sur la mort neuronale et l'agrégation de forme phosphorylée de l' α -synucléine (P- α -synS129) ont été évalués 15 semaines PI. Nous nous sommes placés à un temps où la mort neuronale induite par l'injection α -syn^{A53T} pouvait être amplifiée par la co-injection d'AAV- Δ LRRK2^{G2019S}, qui nous l'avons montré n'est pas toxique à ce temps post-injection. Nous avons donc cherché un temps post-infection et une dose d'AAV- α -syn^{A53T} permettant d'éviter une dégénérescence trop rapide et trop sévère. Nous avons vu que la co-injection Δ LRRK2^{G2019S}/ α -syn^{A53T} potentialise la mort neuronale (environ 20% de mort cellulaire en plus comparée aux injections d' α -syn^{A53T} seul). Nos résultats montrent que cette synergie peut exister lorsque les deux protéines sont co-exprimées spécifiquement et uniquement dans les neurones, suggérant un effet purement « cell-autonomous ». Dans une étude récente, il a été montré que le croisement de souris tau P301S et BAC LRRK2 R1441G n'entraînait pas une aggravation de la pathologie (Mikhail et al., 2015). De manière similaire, le croisement de souris LRRK2^{G2019S} avec des souris APP-PS1, ne modifie pas les atteintes neuropathologiques dans ces souris modèle d'amyloïdose (Lin et al., 2009a). Nous avons montré que Δ LRRK2^{G2019S} n'entraîne pas d'aggravation de la lésion induite par l'expression de la huntingtin mutée (annexe 11.2.2), protéine responsable de la maladie d'Huntington. Ses données suggèrent que la synergie entre LRRK2 et l' α -synucléine n'est pas simplement la conséquence d'une « fragilité » générale des neurones induites par la présence de LRRK2^{G2019S} mais impliquerait bien des voies cellulaires spécifiques et des mécanismes moléculaires propre à ces deux protéines pathologiques.

Il serait intéressant de disséquer en détail les voies mises en jeu conduisant à l'augmentation de toxicité dans notre modèle, en étudiant notamment comment les deux protéines (seules ou combinées) perturbent les voies autophagiques, la physiologie

mitochondriale qui sont deux « voies cellulaires » où LRRK2 et l'α-synucléine semblent intervenir pour produire des atteintes cellulaires.

8.2.3 ROLE DE L'ACTIVITE KINASE

Le rôle de l'activité kinase de LRRK2 peut-être abordé de différentes manières, par l'utilisation de composés pharmacologiques inhibiteurs spécifiques de LRRK2 ou des inhibiteurs de kinases non-spécifiques (détaillés dans la partie 10.3). L'étude du rôle de la kinase peut également être abordée de manière précise à l'aide de forme inactive de LRRK2, ayant des mutations dans le site actif de la kinase. Dans nos expériences nous avons choisi d'utiliser une forme inactive de la kinase (« dead kinase »), possédant la mutation D1994A dans la poche de fixation de l'ATP. Ce mutant, nous a permis d'avoir un contrôle moléculaire très décrit dans la littérature dans des études *in vitro*, et plus récemment, *in vivo* (Xiong et al., 2017). Plusieurs études suggèrent que LRRK2 pourrait via son activité kinase, influencer la phosphorylation de l'α-synucléine, directement comme le suggère le travail de Qing et collaborateurs (Qing et al., 2009) ou indirectement comme le suggèrent les différents travaux de Daher et collaborateurs utilisant des composés inhibiteurs de LRRK2 (Daher et al., 2014, 2015; Guerreiro et al., 2013; Volpicelli-Daley et al., 2016b). Probablement du faite que l'α-synucléine ne soit apparu dans aucunes des études de criblage pour les substrats de LRRK2, l'hypothèse d'une interaction indirecte est privilégiée.

Dans les expériences que nous avons conduites chez le rat avec les d'AAV-ΔLRRK2^{G2019S} et d'AAV-ΔLRRK2^{WT}, nous avons montré que la sur-expression du fragment pathologique pouvait conduire à une dégénérescence des neurons DA dans la SNc. Cet effet n'ayant pas été observé avec le fragment sauvage, nous déduisons que l'augmentation d'activité kinase est responsable de l'effet neurotoxique de la forme pathologique ΔLRRK2^{G2019S}. Cependant nous n'avons pas démontré directement cette hypothèse. En effet, il serait nécessaire de tester l'absence de toxicité de la forme « dead-kinase » d'AAV-ΔLRRK2^{G2019S/D1994A} dans les mêmes conditions expérimentales pour pouvoir affirmer formellement que la toxicité de ΔLRRK2^{G2019S} implique l'activité kinase.

L'agrégation de l'α-synucléine semble être modulée par la présence de LRRK2. Le rôle de l'activité kinase de LRRK2 portant la mutation G2019S dans son interaction avec la toxicité de l'α-synucléine est cependant encore très discutée. Toutes les données concernant le rôle

de LRRK2 dans l'agrégation de l' α -synucléine ne sont pas totalement congruentes, mais globalement LRRK2 semble moduler positivement ou négativement la phosphorylation de l' α -synucléine. Dans nos études nous avons montré qu'à un temps précoce la forme G2019S de Δ LRRK2 induit une perte cellulaire significativement plus importante comparée à la forme « dead kinase » sans pour autant induire de changement dans le nombre de neurones positifs pour la forme phosphorylée de l' α -synS129. A un temps plus tardif, nous avons observé une diminution du nombre de neurones positifs pour la P- α -synS129 chez les animaux co-injectés avec la forme G2019S de Δ LRRK2 et l' α -syn^{A53T} comparé aux animaux co-exprimant l' α -synucléine mutée et la GFP. Cette diminution des agrégats de P- α -synS129 pourrait s'expliquer par une disparition des cellules qui ont dégénéré. Dans le travail pionnier de Lin et collaborateurs, l'analyse des souris double-transgéniques exprimant LRRK2^{G2019S} et l' α -syn^{A53T} montre une dégénérescence (striatum et cortex) plus importante que chez les souris double transgénique LRRK2^{WT} et l' α -syn^{A53T}; Les souris double-transgéniques exprimant LRRK2^{WT} et l' α -syn^{A53T} présentaient une dégénérescence supérieure à celle des souris exprimant seulement l' α -syn^{A53T}. Ces données suggéraient que le niveau d'activité kinase était un élément clé pour amplifier la pathologie induite par l' α -syn^{A53T} (Lin et al., 2009a). Cependant, ces études ne montraient pas directement le rôle de la kinase. En effet, chez les souris transgéniques exprimant une forme tronquée de LRRK2 (large délétion du domaine kinase), la toxicité de l' α -syn^{A53T} était aussi augmentée, de manière similaire à ce qui était observé chez les souris double transgéniques LRRK2^{WT} / l' α -syn^{A53T}. Dans une étude plus récente, il a été montré que LRRK2 G2019S entraîne une augmentation de la forme phosphorylée de l' α -synucléine S129 (P- α -synS129) par rapport à la forme « dead kinase » de LRRK2 (Xiong et al., 2017). L'injection de fibrilles de synucléine dans la SNc de rat exprimant la forme G2019S de LRRK2 (BAC LRRK2) induit une augmentation du nombre d'inclusions positives pour la P- α -synS129 (Volpicelli-Daley et al., 2016b). En revanche, dans un modèle de souris transgéniques co-exprimant l' α -synucléine A53T et LRRK2 G2019S, les analyses biochimiques ont montré une diminution de la P- α -synS129 (Lin et al., 2009a).

Une analyse plus fine de la localisation de l' α -synucléine et de sa forme phosphorylée, P- α -synS129, dans le neurone (localisation nucléaire, somatique, synaptique, membranaire,..) semble nécessaire pour mieux caractériser l'influence de LRRK2 sur les agrégats d' α -

synucléine dans notre modèle. L'inclusion systématique du mutant « dead-kinase » Δ LRRK2^{G2019S/D1994A} dans les expériences pourraient nous aider à déterminer directement le rôle de l'activité kinase de LRRK2 dans ses effets modulateurs sur l' α -synucléine.

Cependant dans nos expériences, nous n'avons pas observé de différence du nombre de cellules immunoréactives pour la phospho- α -synS129 dans les groupes infectés par AAV- Δ LRRK2^{G5} et AAV- α -syn^{A53T}. Il est possible que ces comptages n'aient pas pu mettre en évidence des différences dans la nature/caractéristique des agrégats.

Il serait intéressant d'approfondir la caractérisation des agrégats d' α -syn^{A53T} notamment par des analyses confocales plus précises et des études biochimiques permettant de mieux définir la nature des espèces moléculaires d' α -synucléine.

8.2.4 PHENOTYPE COMPORTEMENTAL

L'analyse comportementale (catwalk et open field) que nous avons réalisée 25 semaines après l'injection des vecteurs AAV ou LV codant pour Δ LRRK2 ne montre pas d'altération du comportement moteur même en présence de la mutation G2019S qui induit une dégénérescence de l'ordre de 30% (article 1). La mort neuronale observée ne semble pas suffisante pour induire une altération de la locomotion détectable dans les tests que nous avons utilisés. Les analyses comportementales réalisées au cours des expériences décrites dans l'article 2 ont été portées en annexe (annexes, 11.2.1). En effet, bien que les résultats soient relativement intrigants, leur interprétation est difficile au regard des données histopathologies portant sur la neurodégénérescence. Par esprit de simplification nous avons choisi de ne pas les inclure directement dans les articles en préparation. Nous avons montré dans une première expérience avec l' α -syn^{A53T}, qu'il était possible de détecter une légère dissymétrie dans l'utilisation de la patte avant contralatérale à la lésion dès 6 semaines (42 % d'utilisation de la patte contralatérale à la lésion), nos analyses réalisées à différents temps ont montrées que cette dissymétrie perdure et s'accroît dans le temps (32 % d'utilisation de la patte contralatérale à la lésion à 15 semaines, Cf. 7.2.1.1). Nous retrouvons dans les expériences de co-injections Δ LRRK2/ α -synucléine à 15 semaines PI (Cf. 10.2.1.1) la même dissymétrie dans les deux groupes injectés avec l' α -synucléine A53T seule ou en combinaison avec la GFP (environ 35 % d'utilisation de la patte contralatérale). En revanche, aucune dissymétrie n'a pu être mesurée à 6 semaines PI, dans les expériences de

co-injections alors que nous avons détecté une dissymétrie à ce même temps PI dans les expériences préliminaire de caractérisation du modèle α -synucléine. En résumé, dans nos expériences, les dissymétries observées sont de relativement faible sévérité. Leur détection semble peu reproductible. L'absence de signes moteurs chez les animaux ayant une perte partielle des neurones dopaminergiques dans la SNC pourrait s'expliquer par des phénomènes de compensation et/ou la faible sensibilité des tests comportementaux utilisés. En effet, chez l'animal et chez l'homme, il semble qu'une perte d'environ 70% des neurones dopaminergiques soit nécessaire pour que des signes moteurs (akinésie) soient détectables. De manière surprenante, la forme « dead kinase » de Δ LRRK2 semble induire une dissymétrie dans le test du cylindre à 15 semaines PI, les formes WT et G2019S quant-à-elles n'induisant pas de dissymétrie. Ce résultat suggère que la sur-expression de la forme « dead kinase » de Δ LRRK2 induit des dérèglements sans pour autant induire de mort cellulaire. Le test de rotation à l'amphétamine n'a jamais montré de net comportement rotatoire, comme il est possible de le voir avec des lésions très sévères de la SNC, notamment celles produites par l'injection de 6-OHDA. En revanche nous avons pu constater qu'à 15 semaines PI, la somme des tours horaires et anti-horaires, reflétant l'activité globale, montre une augmentation significative de l'activité des animaux uniquement dans le groupe co-injecté avec Δ LRRK2^{G2019S} et l' α -syn^{A53T} comparé aux groupes injectés avec l' α -syn^{A53T} seule ou en combinaison avec la GFP. Ce résultat suggère que le système dopaminergique semble altéré chez ces animaux, mais l'absence de reproductibilité de ces observations ainsi que la faible amplitude des changements nous poussent à considérer ces résultats avec précaution.

Les lésions du système dopaminergique que nous induisons avec nos vecteurs ne semblent pas être suffisamment « prononcées » pour induire un phénotype comportemental net et reproductible. Des lésions plus fortes, induites par des doses de vecteurs plus importantes semblent être une stratégie envisageable afin d'induire un phénotype moteur plus net.

8.1 HYPOTHESES SUR LES VOIES MIS EN CAUSES

8.1.1 LA NEUROINFLAMMATION

LRRK2 et l' α -synucléine semblent toutes deux jouer un rôle important dans les processus de neuroinflammation. Le rôle exact de LRRK2 dans la réponse inflammatoire n'est pas bien caractérisée mais de récentes études ont montré que l'inhibition de l'activité kinase de

LRRK2 ou la diminution de son expression atténue la cascade inflammatoire *in vitro* ou *in vivo* (Kim et al., 2012b; Ma et al., 2016; Puccini et al., 2015; Russo et al., 2015). Le traitement par le LPS (Lipopolysaccharide) qui est connu pour provoquer une neuroinflammation en induisant une activation des microglies ne semble pas induire d'activation en cas de traitement avec des inhibiteurs de l'activité kinase de LRRK2 ou des shRNA ciblant LRRK2 (Moehle et al., 2012). De plus, il a été montré que les rats et les souris KO pour LRRK2 sont protégés contre les effets du LPS et semblent être protégés contre l'injection d'AAV-l' α -syn^{WT} (Daher et al., 2014). Ces effets semblent être dépendant du statut d'activation des microglies, le nombre de cellules CD68-positives recrutées en réponse à l' α -synucléine est diminué chez les rats KO LRRK2, la déficience en LRRK2 semble affecter la réponse immunitaire (Wandu et al., 2015). Dans le modèle de rats transgéniques BAC-LRRK2-G2019S, le traitement avec un inhibiteur spécifique de l'activité kinase de LRRK2 (PF-06447475) atténue la neuroinflammation induite par l'injection d'AAV- α -synucléine (Daher et al., 2015). Dans nos expériences de co-infection, nous avons vu que l'injection d' α -syn^{A53T} induit une inflammation, détectée par l'augmentation de la taille des microglies, dans le striatum et dans la SNc. Cette inflammation ne semble pas être affectée par la présence des différentes formes de Δ LRRK2, suggérant que l'augmentation de toxicité que nous observons dans le groupe co-injecté avec Δ LRRK2^{G2019S} et l' α -syn^{A53T} n'est pas due à une activation des microglies plus importante dans ce groupe comparé au groupe co-injecté avec Δ LRRK2^{DK} et l' α -synucléine A53T. **Il serait intéressant de pousser plus loin l'analyse histologique du statut inflammatoire dans nos expériences de co-injection, en regardant plus précisément par une analyse de sholl, par exemple, le nombre de ramification de l'arborisation des microglies et pour compléter les résultats, réaliser des marquages histologiques ciblant les astrocytes. De plus, il serait intéressant de conduire une étude ELISA des cytokines et interleukines pro-inflammatoires qui pourrait être détectées soit dans le liquide-céphalo-rachidien ou dans des prélèvements de cerveaux.**

8.1.2 LES INTERACTEURS COMMUNS ENTRE LRRK2 ET L' α -SYNUCLEINE

LRRK2 et l' α -synucléine pourrait interagir de manière indirecte via des protéines adaptatrices communes. En premier lieu, les protéines 14-3-3 sont particulièrement intéressantes de ce point de vue. Elles semblent être cruciales dans la régulation des neurones

dopaminergiques, notamment en régulant les niveaux de dopamine via leur action sur la TH en combinaison avec l' α -synucléine (Berg et al., 2003). Les protéines de la famille des 14-3-3 sont connues pour interagir avec d'une part la protéine LRRK2 et d'autre part avec l' α -synucléine pour former un complexe protéique de 54-83-kD (Xu et al., 2002). Il a été montré que ces protéines co-localisent avec les CLs, cette séquestration réduirait les propriétés anti-apoptotiques des protéines 14-3-3 et participerait à la toxicité de l' α -synucléine (Berg et al., 2003; Kawamoto et al., 2002). Les protéines 14-3-3 sont sujettes à des phosphorylations réduisant leur potentiel neuroprotecteur (Slone et al., 2015). A ce jour, le rôle de LRRK2 dans cette phosphorylation n'est pas montré mais est suggérée. Nichols et collaborateurs ont montré que les protéines 14-3-3 se lient à la forme phosphorylée de LRRK2, notamment sur les sérines S910 et S935 qui sont constitutivement phosphorylées (Gloeckner et al., 2010; Nichols et al., 2010; West et al., 2007). La liaison des deux protéines stabilise la structure tridimensionnelle de LRRK2 et influence positivement sa dimérisation, (ce qui favoriserait l'activité kinase). L'inhibition de LRRK2 par les inhibiteurs de kinase diminue la phosphorylation en position S935, ce qui conduirait à une diminution d'interaction avec les protéines 14-3-3 (Doggett et al., 2012). L'altération de la liaison 14-3-3/LRRK2 induit une localisation différente de LRRK2 dans la cellule et impacte notamment ses fonctions membranaires (Dzamko et al., 2010; Mamais et al., 2014). Nous pouvons donc spéculer que la séquestration de la protéine 14-3-3 dans les CLs contenant de l' α -synucléine (1) réduirait sa capacité à inhiber les protéines pro-apoptotiques et (2) réduirait la stabilisation de LRRK2 en dimères, favorisant la neurodégénérescence par des voies encore inconnues. Nos constructions ne comportent pas ces sérines N-terminale phosphorylables qui sont importantes pour la liaison avec les protéines 14-3-3. Cependant, nous observons une mort cellulaire dans nos conditions suggérant que plusieurs voies sont mises en jeu pour conduire à la neurodégénérescence.

Il serait intéressant d'étudier dans nos modèles si nous régulons par les différentes formes de Δ LRRK2 la présence des protéines 14-3-3 dans les agrégats d' α -synucléine positifs pour la P- α -synS129.

8.1.3 LA MITOCHONDRIE

La mitochondrie semble au centre de la physiopathologie de la MP. Il est suggéré que l' α -synucléine et LRRK2 pourrait agir toutes deux sur des voies communes au niveau de la mitochondrie, notamment du fait de leur expression mitochondriale (Liu et al., 2009a; Wang et al., 2012a). Dans le modèle de souris transgéniques développé par Lin et collaborateurs co-exprimant l' α -synucléine et LRRK2 mutées, les altérations mitochondriales sont augmentées comparée à l'expression de l' α -syn^{A53T} seule (Lin et al., 2009b). On peut imaginer de nombreux modes d'actions des deux protéines au niveau de la mitochondrie, notamment au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et au niveau de la fission/fusion des mitochondries. Des altérations de ses deux paramètres conduisent à des dysfonctions de la production en énergie (Devi et al., 2008; Loeb et al., 2010; Reeve et al., 2015). Les souris transgéniques exprimant l' α -syn^{A53T} présentent une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire de façon âge-dépendant (Chinta et al., 2010). De même, une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire est retrouvée lorsque des mitochondries isolées sont exposées à des fibrilles de synucléine (Liu et al., 2009b). Les données de la littérature sur la mitochondrie sont plus fournies pour l' α -synucléine que pour LRRK2. Néanmoins, Mortiboys et collaborateurs ont observé une diminution d'activité du complexe III et IV dans les fibroblastes isolés de patients porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. De manière surprenante, les complexes I et II ne sont pas altérés (Mortiboys et al., 2015). Le même type d'observation a été faite dans des cultures de cellules sur-exprimant LRRK2^{G2019S} (Su and Qi, 2013). L'homéostasie mitochondriale est finement régulée notamment par des évènements de fissions/fusions impliquant diverses protéines comme Drp1 (Dynamin-related protein 1), Fis1 ou GDAP1, pour la fission et Mnf1, 2 ou OPA1 pour la fusion. Une réduction de l'expression protéique de Mnf1 et 2, sans changements des niveaux d'expression des protéines Drp1 et OPA1, est observée chez les souris transgéniques exprimant l' α -syn^{A53T}, suggérant une augmentation de la fission mitochondriale (Xie and Chung, 2012). La protéine Drp1 est majoritairement exprimée au niveau du cytoplasme, en cas d'évènement de fission, elle est transportée à la mitochondrie. Il a été montré que LRRK2 favorise la translocation de Drp1 à la mitochondrie, possiblement via des phosphorylations (Su and Qi, 2013). Ces publications sont en faveur d'un effet commun de LRRK2 et l' α -syn^{A53T} au niveau de la mitochondrie.

Il serait intéressant de déterminer dans nos modèles *in vivo* si la synergie entre LRRK2 et l' α -syn^{A53T} dans nos expériences de co-injection, est corrélée à des modifications de la balances fission/fusion par des analyses biochimiques des niveaux de Drp1, Mfs1/2, et des analyses des structures des mitochondries par microscopies confocales et électroniques au niveau des neurones DA infectés.

8.1.4 L'AUTOPHAGIE

La présence d'agrégats d' α -synucléine dans la MP semble confirmer l'état de stress protéolytique. Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome (UPS) pourrait en être la cause. En effet, l' α -synucléine est dégradée par le système autophagique ainsi que par le protéasome (Webb et al., 2003). Un lien concret entre LRRK2, l' α -synucléine et l'autophagie a été mis en évidence dans les études de Saha et collaborateurs, montrant que les mutations G2019S et R1441C de LRRK2 diminue le flux autophagique (Saha et al., 2014). La co-expression des formes mutées de LRRK2 et de l' α -synucléine inhibe significativement plus le flux autophagique que la co-expression avec la forme sauvage de LRRK2 (Saha et al., 2014). LRRK2 interagit avec plusieurs protéines régulatrices de l'autophagie comme Rab7 et Rab5b, des protéines liant le GTP, qui sont impliquées dans le transport des endosomes tardifs et précoces, la biogenèse lysosomale et la fusion autophagosome-lysosome (Gloeckner et al., 2009; Kuwahara et al., 2016; Shin et al., 2008). Rab7 est connu pour favoriser la clairance des agrégats d' α -synucléine (Dinter et al., 2016). Cependant aucune évidence ne montrent que Rab7 et l' α -synucléine interagissent ensemble, pourtant l' α -synucléine interagit avec Rab3, Rab5 et Rab8, suggérant la possibilité d'une interaction indirecte avec Rab7 (Dalfó et al., 2004).

Il serait intéressant d'étudier dans nos modèles de co-injections la modulation de la phosphorylation de Rab7 et plus généralement les marqueurs de l'autophagie, pour déterminer si *in vivo* dans les neurones DA, la dérégulation de l'autophagie est un facteur clé de la synergie entre LRRK2 et l' α -syn^{A53T}.

9 PERSPECTIVES

En plus des pistes déjà abordées dans la discussion précédente, plusieurs perspectives d'études seraient particulièrement intéressantes à envisager, dans la continuité du projet sur LRRK2 et l' α -synucléine. Le laboratoire possède de nombreux domaines d'expertises via les différentes plateformes, dont la plateforme d'imagerie cérébrale par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par tomographie par émission de positons (TEP), plateforme de traitement d'images, la plateforme de développement d'aptamères et la plateforme de vectorisation pour générer de nouveaux outils thérapeutiques. De plus, le laboratoire a été conçu pour pouvoir développer de nouveaux modèles de maladies neurodégénératives chez le primate non-humain, en particulier dans la cadre d'études évaluant de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par ailleurs, le laboratoire entretient de nombreuses collaborations nationales et internationales complétant nos expertises, qui pourraient constituer de réels atouts pour mener nos recherches sur la physiopathologie de la MP, notamment par leur apport méthodologique dans des domaines comme l'électrophysiologie, la microscopie ultra-haute résolution, la protéomique/métabolomique et l'analyse à large échelle des modifications épigénétiques et transcriptomiques.

9.1 VERSATILITE DES VECTEURS UTILISES

Bien que les constructions codées par les AAV ne permettent pas d'exprimer la forme entière de LRRK2, notre modèle (AAV- Δ LRRK2^{G2019S}) se distingue des modèles transgéniques sur plusieurs points. Premièrement il est caractérisé par une perte des neurones dopaminergiques et il présente l'avantage d'être relativement facile à mettre en œuvre. En effet, nombreux sont les laboratoires qui s'intéressent à la MP et maîtrisent la production d'AAVs à forts titres infectieux pour les études *in vivo*. Les vecteurs viraux que nous avons développés peuvent être facilement/rapidement conçus et produits, ce qui faciliterait une dissémination plus large des modèles à de nombreux laboratoires. De plus la versatilité de la conception et production des vecteurs viraux est un avantage important pour mener à bien des études visant à comprendre plus globalement la physiopathologie de LRRK2, sachant qu'il existe, outre la mutation G2019S, des dizaines d'autres mutations répertoriées qui sont localisées dans Δ LRRK2. De plus, l'approche AAV que nous avons développée chez le rat, permet des applications dans d'autres espèces animales, dont la souris, et le primate non

humain (PNH). Le répertoire moteur des PNH bien plus proche du répertoire moteur humain comparé à celui des rongeurs pourrait peut-être permettre d'observer des troubles neurologiques induits par la surexpression de LRRK2. Par ailleurs, la séquence et la structure de l' α -synucléine chez le PNH est très proche de celle de l'homme. **Ainsi il serait très intéressant d'évaluer la toxicité du fragment Δ LRRK2^{G2019S} chez le PNH, pour en particulier déterminer directement si l'augmentation de l'activité kinase de LRRK2 est capable d'augmenter les niveaux d'expression de α -synucléine, et possiblement induire son agrégation. En parallèle, de telles expériences pourraient être décisives pour savoir si la sur-expression de LRRK2 peut induire des anomalies comportementales rappelant les symptômes de MP, en rapport avec des modifications de l' α -synucléine.**

9.2 ORIENTATIONS SCIENTIFIQUES

9.2.1 ALTERATIONS SYNAPTIQUES

Les patients parkinsoniens porteurs de mutations LRRK2 présentent, comme les cas sporadiques de la MP, des anomalies pré-synaptiques dopaminergiques détectées par imagerie TEP utilisant le 18F-6-fluoro-L-Dopa (Adams et al., 2005). De plus, de nombreuses études suggèrent un rôle de LRRK2 et de son activité kinase dans la régulation de l'endocytose de vésicules synaptiques, le trafic des vésicules et la libération des neurotransmetteurs (Arranz et al., 2015; Cinaru et al., 2014). Nos analyses transcriptomiques suggèrent que Δ LRRK2^{G2019S} muté induit des altérations synaptiques dans le striatum dès 6 semaines PI, diminuant l'expression des ARNm codant pour les protéines Hpc4, Rgs4, Grin2a, Rph3a, Snap25, Cnr1 et Tac 1. S'il s'avère que le même type de résultat est retrouvé dans la SNc, il serait intéressant de compléter nos données par une approche plus fonctionnelle en étudiant les propriétés électrophysiologiques des neurones DA de la SNc exprimant Δ LRRK2^{G2019S} ainsi que l'impact des possibles dysfonctions sur les neurones du striatum comme l'a déjà suggéré l'étude sur les rats transgéniques LRRK2 exprimant la mutation R1441C (Sloan et al., 2016). Des analyses par microscopie électronique du nombre de synapses sur les neurones du striatum seraient également très complémentaires pour mieux appréhender les effets précoces des mutations de LRRK2.

9.2.2 DEVELOPPEMENT D'APTAMERE CIBLANT LRRK2

Les inhibiteurs pharmacologiques de LRRK2 sont de plus en plus sélectifs à l'activité kinase de LRRK2 mais ces composés induisent des effets secondaires, notamment périphériques, du fait que LRRK2 est très exprimé au niveau des reins (Atashrazm and Dzamko, 2016). Ce qui ralentit le passage en clinique de ses composés. Une autre stratégie serait d'utiliser des composés que l'on pourrait diriger spécifiquement au cerveau. Le développement d'aptamères peptidiques ou nucléotidiques possédant une spécificité pour le cerveau et ciblant spécifiquement LRRK2 est une stratégie prometteuse (Lee et al., 2012) que nous avons initiée au laboratoire en collaboration avec le groupe de Frédéric Ducongé.

9.2.3 IMAGERIE RMN ET TEP CORRELEE A L'HISTOLOGIE

L'imagerie TEP est une méthode de choix pour suivre les lésions du système dopaminergique en préclinique et en clinique, notamment, parce que les radio-traçeurs utilisés sont très bien caractérisés. L'imagerie TEP permet d'obtenir un suivi longitudinal de la lésion induite de manière non-invasive, permettant de comparer pour un même animal l'évolution de la dé-afférentation par la mesure de la synthèse de la dopamine (accumulation de [18F]-fluoro-L-Dopa), les taux de l'AADC (18F-methyl-tyrosine), les niveaux de DAT ([11C]methylphenidate ou [11C]-PE2I), et la libération de dopamine dans la fente synaptique au niveau du striatum ([11C]raclopride) (Lettfuss et al., 2012; Sossi et al., 2012). Nous pourrions utiliser l'IRM (pondérée en T2) pour suivre la dégénérescence de la SNc dans les expériences de co-injection, comme c'est le cas pour les modèles rats injectés avec du 6-OHDA (Kondoh et al., 2005). Il serait particulièrement pertinent dans nos modèles expérimentaux d'évaluer le potentiel de nouveaux biomarqueurs d'IRM sensible à la présence de fer (séquences T2*) pour suivre la toxicité des formes mutées de LRRK2, comme cela a été développé chez les porteurs sains de la mutation LRRK2 G2019S et mutation parkin (Pyatigorskaya et al., 2015). Il serait très informatif de pouvoir corréliser les données obtenues par ces différentes modalités d'imagerie (TEP, IRM...) à différents marquages histologique, en particulier l'immunofluorescence du système dopaminergique (TH). Les outils informatiques de pointe pour effectuer le recalage de ces différents types d'imagerie ont été développés au laboratoire par le groupe de Thierry Delzescaux. Cette approche multimodalité permettrait

de définir plus finement l'évolution de la dégénérescence des neurones de la SNc et des fibres de la voie nigro-striée projetant sur le striatum.

Annexes

10 ANNEXES

10.1 ARTICLE 1

10.1.1 ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

En parallèle des expériences *in vitro* de biochimie visant à évaluer l'activité des différents fragments de Δ LRRK2, nous avons réalisé des expériences d'injection de LV codant pour le fragment Δ LRRK2 dans sa forme WT, G2019S ou « kinase inactive » (DK), dans le striatum de rat afin de caractériser les effets des trois formes par une analyse transcriptomique. Cette expérience a été réalisée dans le striatum pour faciliter le prélèvement de la zone injectée (Zone GFP positive), le striatum étant une structure relativement homogène.

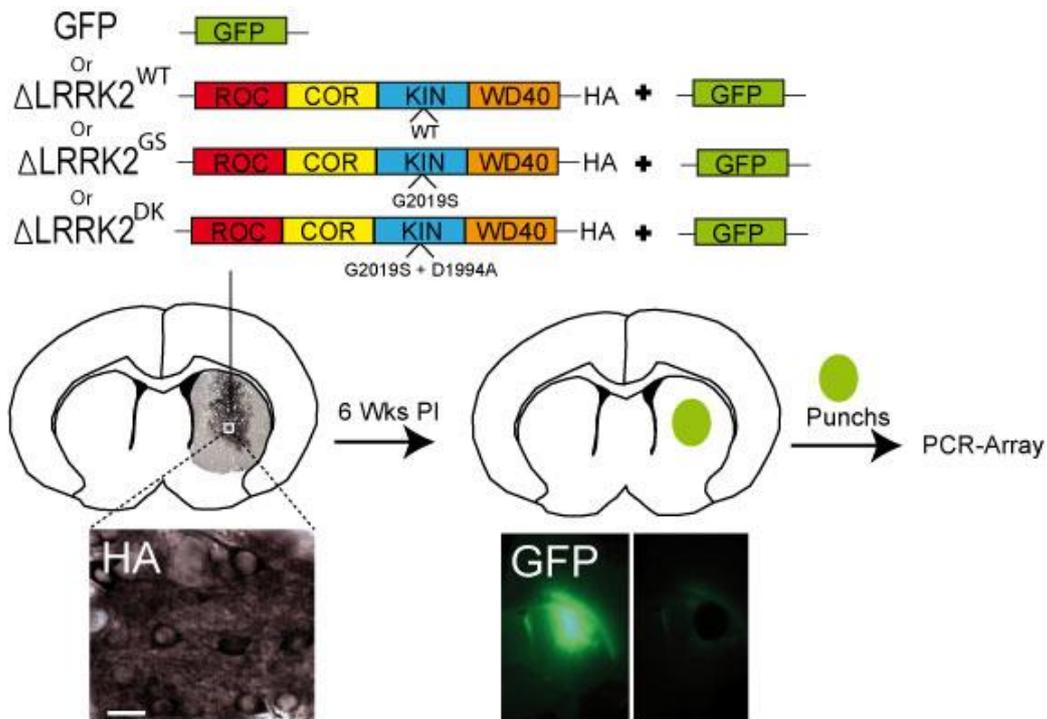


Figure 26 : schéma expérimentale de l'expérience de transcriptomique.

Les lentivirus codant pour les différentes formes de Δ LRRK2 ont été co-injectés dans le striatum avec la GFP pour faciliter la dissection de la zone injectée. 6 semaines après l'injection, la zone GFP positive a été prélevée pour des analyses transcriptomique.

Les différents fragments de Δ LRRK2 (WT, G2019S et DK) ont été co-injectés avec un vecteur LV codant pour la GFP dans le striatum de rat. Six semaines après l'injection des vecteurs, la zone GFP positive correspondant au site d'injection a été dissequée puis homogénéisée dans une solution de trizol. Les échantillons ont ensuite été processés selon les recommandations du kit Quiagen (RT2 profiler PCR arrays)

Nous avons dans un premier temps utilisé une plaque commerciale (Huntington's disease RT2 profiler PCR arrays) pour évaluer l'effet de nos fragments sur l'expression de produits de gènes striataux connus pour être impactés dans la maladie de Huntington. Nous avons vérifié en parallèle que les trois formes de Δ LRRK2 s'expriment de façon comparable (**Figure 26**). Parmi les 80 produits de gènes testés, les gènes pour lesquels les analyses statistiques montraient un effet spécifique de Δ LRRK2^{G2019S} ont été sélectionnés et de nouveau validés par une autre méthode de RT-PCR pour éviter les faux-positifs. Les analyses par « pathways » montrent que Δ LRRK2^{G2019S} n'a aucuns effets sur les produits de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose (**Figure 27**). En revanche, l'analyse statistique montre que Δ LRRK2^{G2019S} a un effet sur la transduction synaptique en diminuant l'expression des ARNm codant pour les protéines Hpca, Rgs4, Grin2a, Rph3a, Snap25, Cnr1 et Tac 1. Les résultats montrent aussi une nette augmentation de l'expression en ARNm d'une protéine importante dans le maintien de l'homéostasie redox, Bbox1, spéciquement dans la condition GS. De manière quasi générale, nous observons que la forme « kinase inactive » de Δ LRRK2 restore, à un niveau proche du niveau observé dans la condition WT, suggerant que ces changements sont médiés par l'activité kinase amplifiée lié à la mutation G2019S.

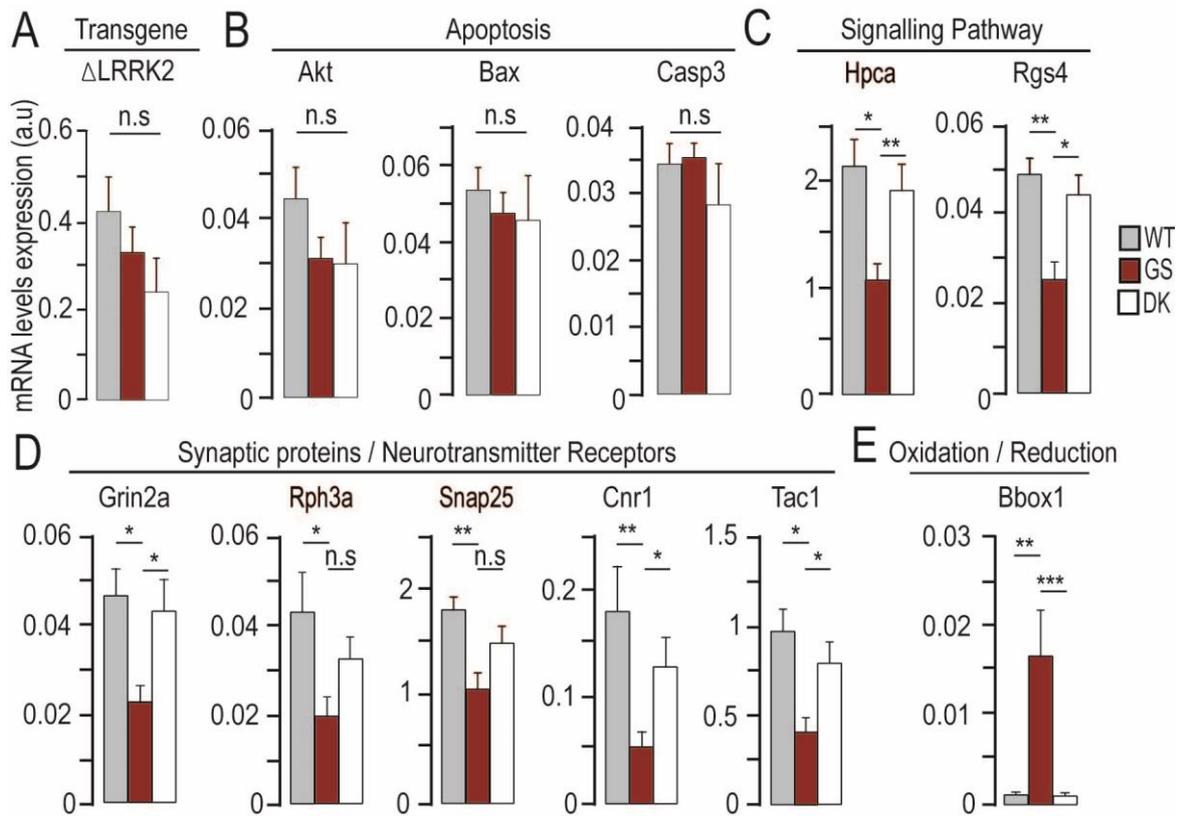


Figure 27: Analyse transcriptomique.

(A) Le niveau de mRNA codant pour les différentes formes de Δ LRRK2 a été mesuré par RT-qPCR. (B) Aucun changement majeur dans l'expression de gène codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose n'a été mesuré (Akt, AKT Serine/Threonine Kinase 1; Bax, BCL2 Associated X et Casp3, Caspase 3). (C-E) L'analyse statistique montre que les produits de gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et dans le maintien de l'homéostasie redox sont spécifiquement impactés par la mutation G2019S (Hpca, hippocalcin; Rgs4, regulator of G protein signalling 4; Grin2a, NMDA receptor subunit A; Rph3a, rabphilin 3a; Snap25, synaptosomal-associated protein 25; Cnr1, cannabinoid receptor 1; Tac1, preprotachykinin/substance P). (E) (Bbox1, gamma-butyrobetaine dioxygenase). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p > 0.001$, Kruskal-Wallis, ANOVA and Mann-Whitney tests ($n=6$ /group).

10.2 ARTICLE 2

10.2.1 COMPORTEMENT

10.2.1.1 TEST DU CYLINDRE

Le test du cylinder a été utilisé pour évaluer la dyssimétrie induite par l'injection unilatérale des vecteurs AAV. Les rats sont placés dans un cylindre transparent pendant 5 minutes et nous enregistrons pendant toute la durée du test. Naturellement l'animal va se redresser et explorer son environnement en touchant les parois latérales du cylindre. Les films sont ensuite visionnés à plus faible vitesse, et nous comptons le nombre de fois que l'animal touche la paroi avec la patte gauche, droite ou avec les deux pattes. Les données sont reportées en pourcentage d'utilisation de la patte contralatérale à l'injection des vecteurs avec la formule suivante : $[(\text{contralateral} + \frac{1}{2} \text{both}) / (\text{ipsilateral} + \text{contralateral} + \text{both})] \times 100$ (Gombash et al., 2013).

10.2.1.2 ROTATION A L'AMPHÉTAMINE

L'amphétamine est une drogue stimulant le système dopaminergique. Dans le cas de lésion unilatérale importante de la SNc ou du striatum, l'injection intra-péritonéale d'amphétamine induit un comportement forcé de rotation dans le sens anti-horaire si la lésion est réalisée à gauche. Les rats reçoivent une injection intra-péritonéale de (+)-Methamphetamine hydrochloride C-IIN (2.5mg/kg, M8750, Sigma) puis ils sont accrochés par des harnais et placés dans des cylindres. Ce système permet d'enregistrer automatiquement le nombre de tours que l'animal effectue pendant 90 min (diamètre: 40 cm, Bioseb, Multicounter LE806). Nous avons testé ce paradigme 4 mois après lésion du MFB (medial forebrain bundle) induite par l'injection stéréotaxique de 6-hydroxydopamine. Les animaux lésés présentaient un net comportement de rotation (environ 700 tours dans le sens anti-horaire contre 3 dans le sens horaire).

10.2.1.3 RESULTATS

Lors de nos expériences préliminaires présentées dans la partie 8.1.1 nous avons mis au point le test du cylindre. Nous avons observé que dès 6 semaines l'injection d' $\alpha\text{-syn}^{\text{A53T}}$ induit une dyssimétrie dans l'utilisation des pattes avant, de l'ordre de 42% d'utilisation de la

patte contralatérale à 6 semaines PI allant jusqu'à 32 % à 15 semaines. Les mêmes tests de comportements ont été réalisés dans le cadre de l'article 2.

Tests comportementaux des animaux injectés avec Δ LRRK2 seul à 15 semaines PI

Les résultats montrent que seuls les animaux injectés avec la forme Δ LRRK2^{DK} présentent une dyssymétrie dans le test du cylindre. Nous n'avons pas observés de net comportement rotatoire dans le test de rotation à l'amphétamine. Aucune différence n'est détectée dans le test de rotation à l'amphétamine même lorsque l'on somme les rotations dans les deux sens.

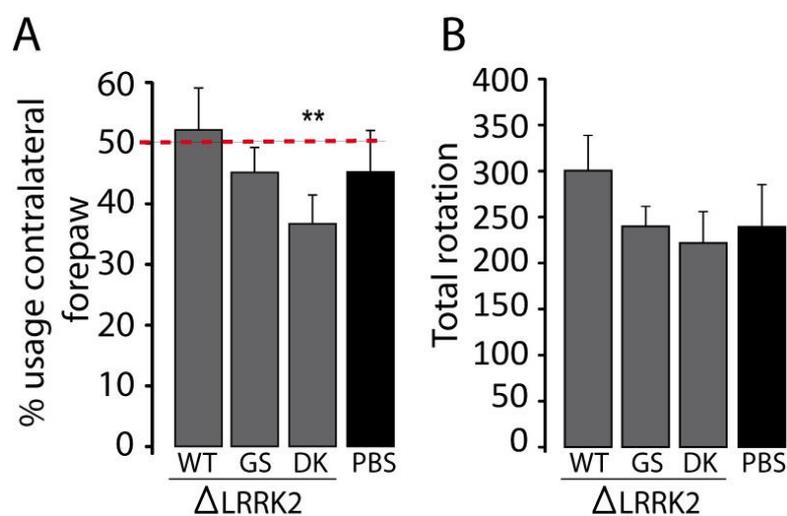


Figure 28: Tests comportementaux des animaux injectés avec Δ LRRK2 seul à 15 semaines PI.

(A) Test du cylindre, (B) test de rotation à l'amphétamine. Les tests statistiques sont réalisés par rapport à la valeur théorique de 50 % d'utilisation des pattes.

Tests comportementaux des animaux co-injectés avec Δ LRRK2 et l' α -synucléine à 15 semaines PI.

Les résultats montrent que seuls les animaux injectés avec la forme α -syn^{A53T} seule ou en combinaison avec la GFP présentent une dyssymétrie dans le test du cylindre. La moyenne d'utilisation de la patte contralatérale exprimée en pourcentage est significativement différente d'une valeur théorique de 50 % d'utilisation (rat non lésé). Nous n'avons pas observés de net comportement rotatoire dans le test de rotation à l'amphétamine dans nos différents groupes. En revanche, lorsque nous sommes les rotations dans les deux sens, reflet d'une activité globale, les animaux co-injectés avec Δ LRRK2^{G2019S} et α -syn^{A53T} présentent une hyper-activité comparée aux groupes injectés avec α -syn^{A53T} seule ou en combinaison avec la GFP.

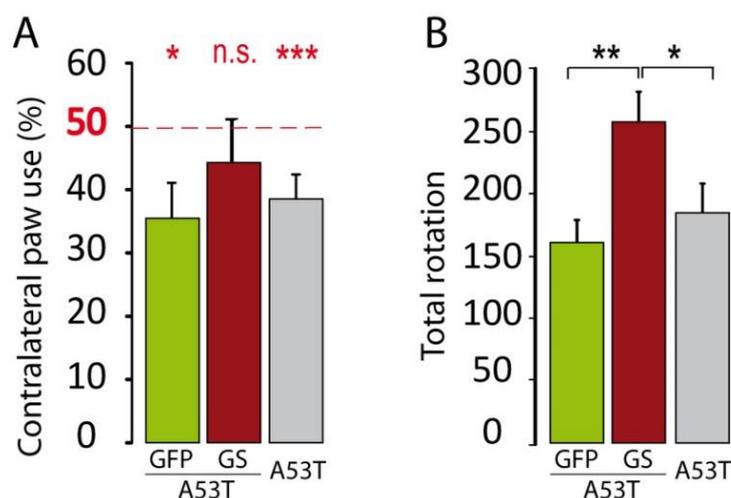


Figure 29: Tests comportementaux des animaux co-injectés avec Δ LRRK2 et l' α -synucléine à 15 semaines PI.

(A) Test du cylindre, (B) test de rotation à l'amphétamine. Les tests statistiques sont réalisés par rapport à la valeur théorique de 50 % d'utilisation des pattes. Tests statistiques pour le test de rotation : ANOVA à un facteur puis post-hoc LSD Fischer.

Tests comportementaux des animaux co-injectés avec Δ LRRK2 et l' α -synucléine à 6 semaines

PI

Les résultats ne montrent pas de différence significative entre nos différents groupes dans le test du cylindre à 6 semaines PI. Nous n'avons pas observés de net comportement rotatoire dans le test de rotation à l'amphétamine dans nos différents groupes.

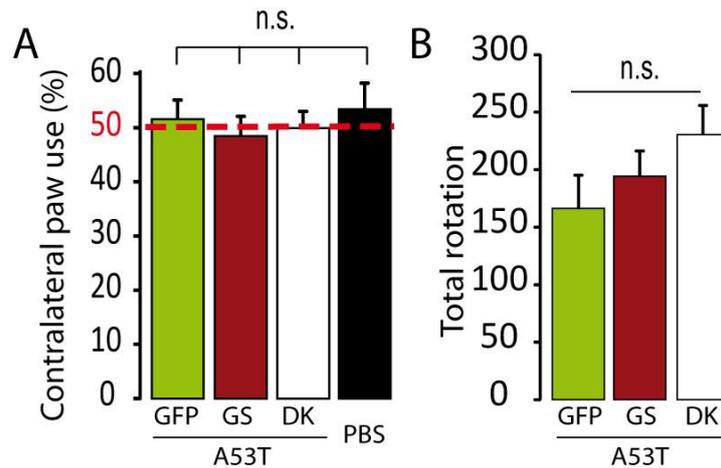


Figure 30: Tests comportementaux des animaux co-injectés avec Δ LRRK2 et l' α -synucléine à 6 semaines PI.

(A) Test du cylindre, (B) test de rotation à l'amphétamine. Les tests statistiques sont réalisés par rapport à la valeur théorique de 50 % d'utilisation des pattes.

10.2.2 EXPERIENCE DE CO-EXPRESSION Δ LRRK2/HUNTINGTINE82Q

Cette étude a été réalisée dans le cadre du stage de Master 2 de Daniela Molina (ENS, Santiago du Chili) et Camille Gardier (Master toxicologie, université de pharmacie de Châtenay-malabry).

Objectif de l'étude :

LRRK2 est une protéine très exprimée dans le striatum de souris. Dans des expériences précédentes, dans le cadre du projet marqueur striataux mené au laboratoire, nous avons observé que LRRK2 pouvait être considéré comme un « marqueur moléculaire » du striatum (Brochier et al., 2008; Francelle et al., 2014, 2015).

L'objectif de ce projet a été d'étudier si nos constructions de LRRK2 induisaient un changement de toxicité du fragment N-terminal de la huntingtin mutée (expansion de 82 glutamines).

Procédures expérimentales :

Les constructions Δ LRRK2 (sans la sérine) WT, G2019S ou DK clonées dans un vecteur lentiviral, ont été co-injectées avec un vecteur lentiviral codant pour la huntingtine mutée (mHtt) dans le striatum de souris. En condition contrôle, la mHtt a été co-injectée avec un vecteur codant pour la protéine LacZ. L'injection de la mHtt dans le striatum de souris induit l'apparition d'une lésion au niveau de la zone d'injection dont la taille est quantifiable par la perte de plusieurs marqueurs tels que le NeuN (neuronal nuclear), la cytochrome C oxydase, le Dopamine and cAM regulated neuronal phosphoprotein (DARPP32). La présence d'agrégats de mHtt est évaluée en quantifiant le volume occupé par la présence d'agrégats positifs pour l'ubiquitine ainsi que le nombre d'agrégats positifs pour le marquage Em48. Toutes ses mesures ont été réalisées de manière volumétrique par des analyses sur plusieurs coupes sériées pour chaque animal.

Quantification NeuN

Le volume de lésion induit par l'injection des différentes combinaisons de vecteurs a été déterminé sur la base de l'immunohistochimie du NeuN, afin d'avoir un index de la mort neuronale. Les résultats présentés dans l'histogramme ne montrent pas de différence majeure entre notre groupe contrôle, injecté avec la Htt82Q et LacZ, et les groupes injectés avec Htt82Q et les différentes formes de Δ LRRK2.

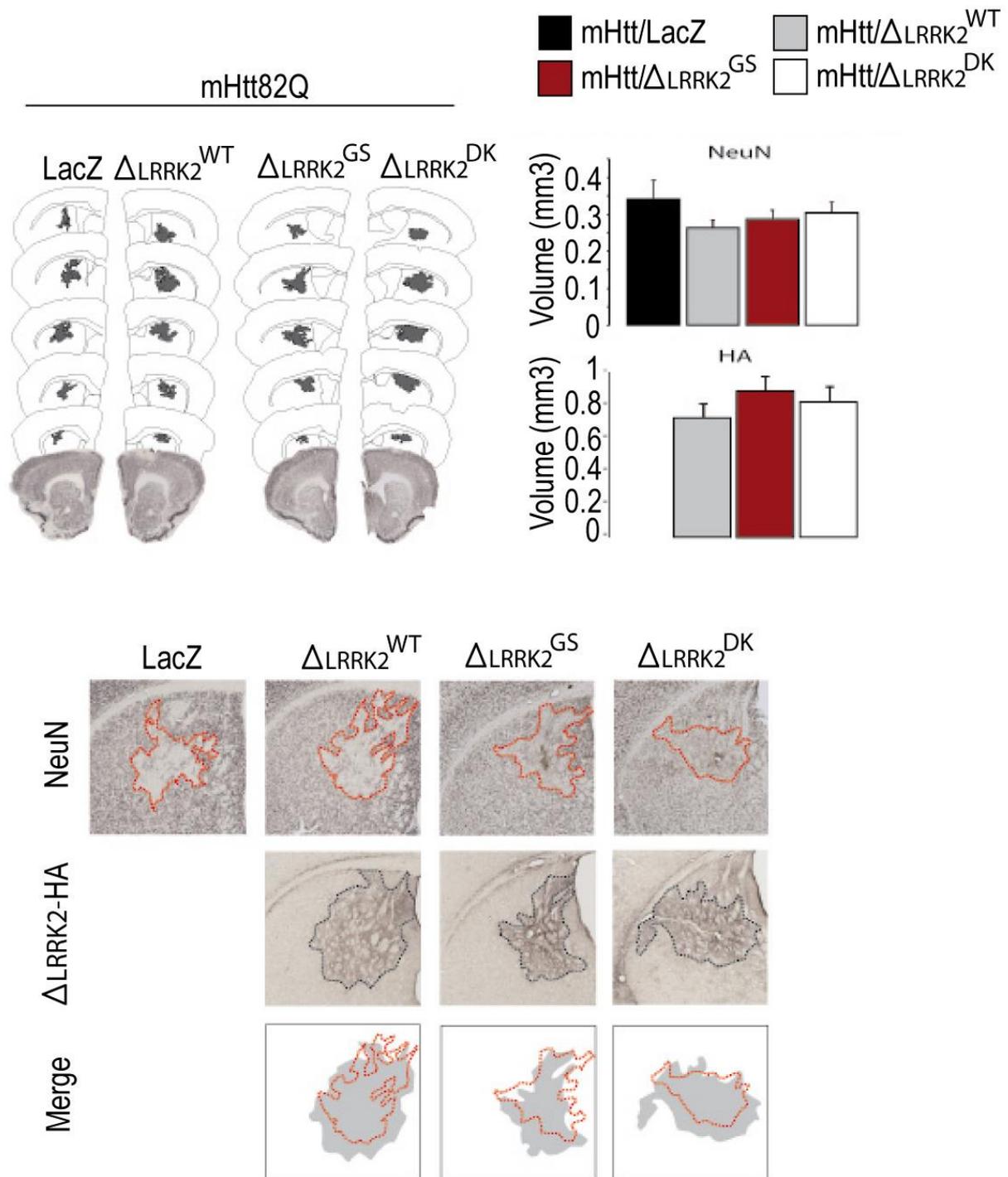


Figure 31: Mesure du volume de la lésion induite par la sur-expression de mHtt, marquage NeuN et HA.

Nous avons réalisé des coupes sériées et quantifié le volume de lésion sur 6 coupes espacées de 300 μ m. Un marquage NeuN et HA a été réalisé sur des séries de coupes adjacentes. Pour chaque coupe, la taille de la lésion a été délimitée sur le logiciel Mercator. Le logiciel a ensuite calculé automatiquement le volume de lésion (en mm³).

Quantification Cox, DARP32 :

La quantification sur ces deux marqueurs révèle un état de souffrance des cellules contrairement au marquage NeuN qui nous sert à quantifier une mort neuronale. Aucune différence statistique dans la taille de lésion n'a pu être mise en évidence.

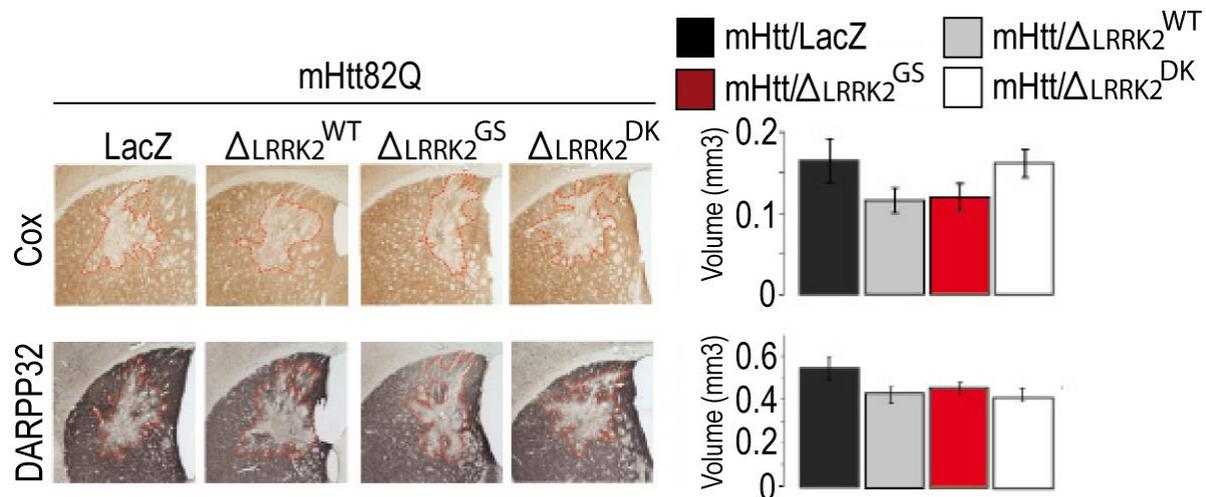


Figure 32: Mesure du volume de la lésion induite par la sur-expression de mHtt, marquage Cox et DARP32.

Un marquage Cox et DARP32 a été réalisé sur des séries de coupes adjacentes. Pour chaque coupe, la taille de la lésion a été délimitée sur le logiciel Mercator. Le logiciel a ensuite calculé automatiquement le volume de lésion (en mm³).

Quantification ubiquitine, Em48 :

De manière cohérente, la quantification du volume immunomarqué par l'ubiquitine se révèle assez proche du volume quantifié à partir du marquage HA. Aucune différence n'a été observée entre les différents groupes. La quantification stéréologique du nombre d'agrégats immunomarqués par l'anticorps Em48 montre une nette augmentation significative du nombre d'agrégats de mHtt uniquement dans le groupe co-injecté avec la mHtt et ΔLRRK2^{G2019S}. De manière intéressante, cette augmentation semble dépendante de l'activité kinase de ΔLRRK2 car elle n'est ni observée dans la condition ΔLRRK2^{WT} ou « Dead kinase » qui sont au même niveau que la condition contrôle, mHtt co-injectée avec LacZ.

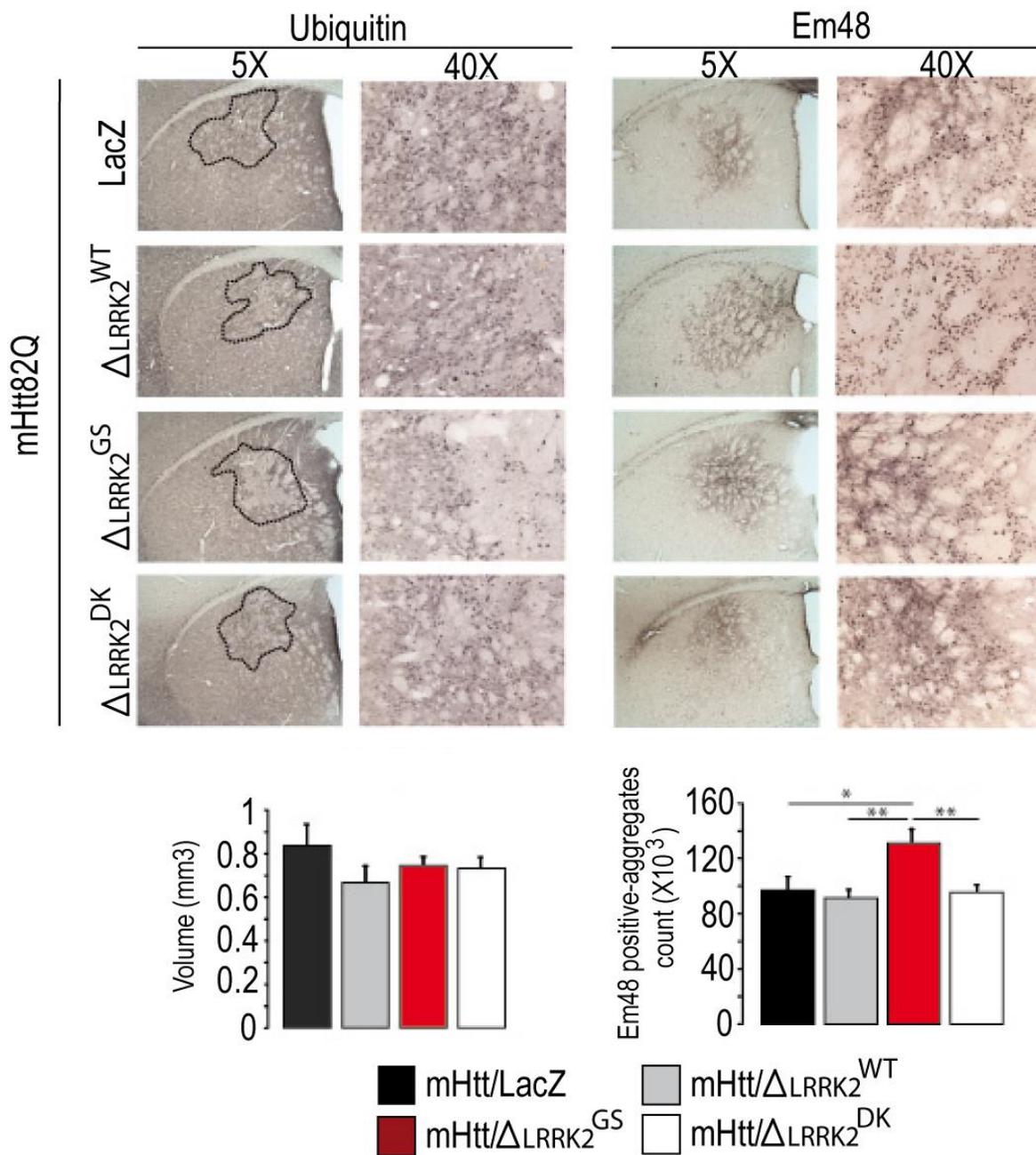


Figure 33: Mesure de l'agrégation de la Htt mutée, marquage ubiquitine et Em48.

Un marquage ubiquitine et Em48 a été réalisé sur des séries de coupes adjacentes. Pour chaque coupe, la taille de la lésion a été délimitée sur le logiciel Mercator. Le logiciel a ensuite calculé automatiquement le volume de lésion (en mm³). La quantification du nombre d'agrégats positifs pour Em48 a été réalisée par stéréologie (logiciel Mercator).

10.3 GENERALE

10.3.1 LES INHIBITEURS DE LRRK2

Depuis la découverte de LRRK2 et notamment du fait que la toxicité de cette protéine soit en grande partie de la faute de l'activité kinase, les industries pharmaceutiques ont concentré leurs efforts sur le développement de composés capables d'inhiber cette activité kinase. Plusieurs générations de composés ont été générées : les composés non sélectifs, les composés de première génération, et les composés de seconde génération qui sont plus sélectifs pour LRRK2.

Références	Composé	Perméabilité à la Barrière hémato-encéphalique
(Deng et al., 2011)	LRRK2-IN-1	NON
(Ramsden et al., 2011)	CZC-54252	NON
(Ramsden et al., 2011)	CZC-25146	NON
(Choi et al., 2012)	HG-10-102-1	YES
(Reith et al., 2012)	GSK2578215A	YES
(Hatcher et al., 2015)	JH-II-127	YES
(Hatcher et al., 2015)	GNE-7915	YES
(Estrada et al., 2014)	GNE-0877	YES
(Estrada et al., 2014)	GNE-9605	YES
(Troxler et al., 2013)	Indolinone 5	YES
(Göring et al., 2014)	Indolinone 15b	YES
(Henderson et al., 2015)	PF-06447475	YES
(Fell et al., 2015)	MLi-2	YES

Table 9: Liste des inhibiteurs de LRRK2 (Atashrazm and Dzamko, 2016; Taymans and Greggio, 2016; West, 2015)

10.3.2 PRODUCTION SCIENTIFIQUE

10.3.2.1 PUBLICATIONS

LRRK2 and α -synuclein: in the intimacy of their relationship.

Cresto N et al., 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 α -synuclein *in vivo*

Cresto N et al., En soumission

Neuron selective overexpression of the C-terminal domain of LRRK2 with the G2019S mutation produces neurodegeneration of the substantia nigra.

Cresto N et al., En soumission

Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. Bouvier E, Brouillard F, Molet J, Claverie D, Cabungcal JH, **Cresto N**, Doligez N, Rivat C, Do KQ, Bernard C, Benoliel JJ, Becker C. Mol Psychiatry. 2016

Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, **Cresto N**, Dieme MJ, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L, Huberfeld G. Sciences Translational Medicine. 2014

10.3.2.2 COMMUNICATIONS ORALES

AD/PD, Vienne, Austria.

Selected for a talk in March 2017

Society for Neurosciences 2015 (SfN), Chicago, Illinois, USA.

Selected for a talk in October 2015

10.3.2.3 POSTERS

NeuroFrance, Bordeaux, France. **Selected for poster in May 2017**

World Parkinson Congress 2016 (WPC), Portland, Oregon, USA.

AD/PD 2015, Nice, France.

Références

Aasly, J.O., Vilariño-Güell, C., Dachsel, J.C., Webber, P.J., West, A.B., Haugarvoll, K., Johansen, K.K., Toft, M., Nutt, J.G., Payami, H., et al. (2010). Novel Pathogenic Lrrk2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *25*, 2156–2163.

Adams, J.R., Netten, H. van, Schulzer, M., Mak, E., Mckenzie, J., Strongosky, A., Sossi, V., Ruth, T.J., Lee, C.S., Farrer, M., et al. (2005). PET in LRRK2 mutations: comparison to sporadic Parkinson's disease and evidence for presymptomatic compensation. *Brain* *128*, 2777–2785.

Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* *12*, 366–375.

Alegre-Abarrategui, J., Ansorge, O., Esiri, M., and Wade-Martins, R. (2008). LRRK2 is a component of granular alpha-synuclein pathology in the brainstem of Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *34*, 272–283.

Alegre-Abarrategui, J., Christian, H., Lufino, M.M.P., Mutihac, R., Venda, L.L., Ansorge, O., and Wade-Martins, R. (2009). LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4022–4034.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D., and DeLong, M.R. (1990). Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog. Brain Res.* *85*, 119–146.

Amschl, D., Neddens, J., Havas, D., Flunkert, S., Rabl, R., Römer, H., Rockenstein, E., Masliah, E., Windisch, M., and Hutter-Paier, B. (2013). Time course and progression of wild type α -Synuclein accumulation in a transgenic mouse model. *BMC Neurosci.* *14*, 6.

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 α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J. Biol. Chem.* *281*, 29739–29752.

Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* *12*, 25–31.

Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *28*, 811–813.

Ara, J., Przedborski, S., Naini, A.B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. (1998). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure

to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 7659–7663.

Arawaka, S., Wada, M., Goto, S., Karube, H., Sakamoto, M., Ren, C.-H., Koyama, S., Nagasawa, H., Kimura, H., Kawanami, T., et al. (2006). The Role of G-Protein-Coupled Receptor Kinase 5 in Pathogenesis of Sporadic Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *26*, 9227–9238.

Arnesen, T., Van Damme, P., Polevoda, B., Helsens, K., Evjenth, R., Colaert, N., Varhaug, J.E., Vandekerckhove, J., Lillehaug, J.R., Sherman, F., et al. (2009). Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8157–8162.

Arranz, A.M., Delbroek, L., Kolen, K.V., Guimarães, M.R., Mandemakers, W., Daneels, G., Matta, S., Calafate, S., Shaban, H., Baatsen, P., et al. (2015). LRRK2 functions in synaptic vesicle endocytosis through a kinase-dependent mechanism. *J Cell Sci* *128*, 541–552.

Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M.G., O'Reilly, E., McCullough, M.L., Calle, E.E., Schwarzschild, M.A., and Thun, M.J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *60*, 197–203.

Atashrazm, F., and Dzamko, N. (2016). LRRK2 inhibitors and their potential in the treatment of Parkinson's disease: current perspectives.

Athanasopoulos, P.S., Jacob, W., Neumann, S., Kutsch, M., Wolters, D., Tan, E.K., Bichler, Z., Herrmann, C., and Heumann, R. (2016). Identification of protein phosphatase 2A as an interacting protein of leucine-rich repeat kinase 2. *Biol. Chem.* *397*, 541–554.

Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* *152*, 879–884.

Baekelandt, V., De Strooper, B., Nuttin, B., and Debyser, Z. (2000). Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *2*, 540–554.

Bailey, R.M., Covy, J.P., Melrose, H.L., Rousseau, L., Watkinson, R., Knight, J., Miles, S., Farrer, M.J., Dickson, D.W., Giasson, B.I., et al. (2013). LRRK2 phosphorylates novel tau epitopes and promotes tauopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *126*, 809–827.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.

Ballard, P.A., Tetrud, J.W., and Langston, J.W. (1985). Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* *35*, 949–956.

Barceló-Coblijn, G., Golovko, M.Y., Weinhofer, I., Berger, J., and Murphy, E.J. (2007). Brain neutral lipids mass is increased in α -synuclein gene-ablated mice. *J. Neurochem.* *101*, 132–141.

Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., et al. (2008). Genome-wide association defines more than thirty distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* *40*, 955–962.

Bartels, T., Choi, J.G., and Selkoe, D.J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* *477*, 107–110.

Bartels, T., Kim, N.C., Luth, E.S., and Selkoe, D.J. (2014). N-Alpha-Acetylation of α -Synuclein Increases Its Helical Folding Propensity, GM1 Binding Specificity and Resistance to Aggregation. *PLOS ONE* *9*, e103727.

Benazzouz, A., Gross, C., Féger, J., Boraud, T., and Bioulac, B. (1993). Reversal of Rigidity and Improvement in Motor Performance by Subthalamic High-frequency Stimulation in MPTP-treated Monkeys. *Eur. J. Neurosci.* *5*, 382–389.

Benner, E.J., Banerjee, R., Reynolds, A.D., Sherman, S., Pisarev, V.M., Tshiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S., Mosley, R.L., et al. (2008). Nitrated α -Synuclein Immunity Accelerates Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons. *PLOS ONE* *3*, e1376.

Berg, D., Holzmann, C., and Riess, O. (2003). 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 752–762.

Berger, Z., Smith, K.A., and 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 (Mosc.)* *49*, 5511–5523.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* *3*, 1301–1306.

Bezard, E., Gross, C.E., Fournier, M.C., Dovero, S., Bloch, B., and Jaber, M. (1999). Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp. Neurol.* *155*, 268–273.

Bezard, E., Yue, Z., Kirik, D., and Spillantini, M.G. (2013). Animal Models of Parkinson's Disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *28*, 61–70.

Bhattacharjee, A.K., Ueyama, T., Kondoh, T., Hayashi, S., Abouelfetouh, A., Sakai, N., Saito, N., and Kohmura, E. (2004). In vivo transgene expression using an adenoviral tetracycline-regulated system with neuron-specific enolase promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *317*, 1144–1148.

Biernacka, J.M., Armasu, S.M., Cunningham, J.M., Ahlskog, J.E., Chung, S.J., and Maraganore, D.M. (2011). Do interactions between SNCA, MAPT, and LRRK2 genes contribute to Parkinson's disease susceptibility? *Parkinsonism Relat. Disord.* *17*, 730–736.

- Biskup, S., and West, A.B. (2009). Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 625–633.
- 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.
- Blesa, J., and Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 8.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2012). Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012.
- Bokhoven, M., Stephen, S.L., Knight, S., Gevers, E.F., Robinson, I.C., Takeuchi, Y., and Collins, M.K. (2009). Insertional Gene Activation by Lentiviral and Gammaretroviral Vectors. *J. Virol.* 83, 283–294.
- Bose, A., and Beal, M.F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 139, 216–231.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* 4.
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., and Rüb, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J. Neurol.* 249 Suppl 3, III/1-5.
- 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.
- Brown, D.R. (2007). Interactions between metals and alpha-synuclein--function or artefact? *FEBS J.* 274, 3766–3774.
- Buchanan, S.G., and Gay, N.J. (1996). Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 65, 1–44.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Südhof, T.C. (2010). α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* 329, 1663–1667.
- Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2012). Systematic mutagenesis of α -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 15227–15242.
- Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., McIlwain, K.L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., et al. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8797–8807.

- Caesar, M., Felk, S., Aasly, J.O., and Gillardon, F. (2015). Changes in actin dynamics and F-actin structure both in synaptoneurosome of LRRK2(R1441G) mutant mice and in primary human fibroblasts of LRRK2(G2019S) mutation carriers. *Neuroscience* 284, 311–324.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B., and Bernardi, G. (1996). The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 19, 19–24.
- Campbell, B.C., McLean, C.A., Culvenor, J.G., Gai, W.P., Blumbergs, P.C., Jäkälä, P., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Li, Q.X. (2001). The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 76, 87–96.
- Cao, H., Zhang, G., Wang, X., Kong, L., and Geller, A.I. (2008). Enhanced nigrostriatal neuron-specific, long-term expression by using neural-specific promoters in combination with targeted gene transfer by modified helper virus-free HSV-1 vector particles. *BMC Neurosci.* 9, 37.
- Cardoso, S.M., and Esteves, A.R. (2015). LRRK2 a pivotal player in mitochondrial dynamics and lysosomal clustering: highlights to sporadic Parkinson's disease. *Ther. Targets Neurol. Dis.* 2.
- Castagnet, P.I., Golovko, M.Y., Barceló-Coblijn, G.C., Nussbaum, R.L., and Murphy, E.J. (2005). Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from α -synuclein gene-ablated mice. *J. Neurochem.* 94, 839–849.
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M., and Südhof, T.C. (2005). α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396.
- 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 Lond. Engl.* 364, 1167–1169.
- Chen, C.-Y., Weng, Y.-H., Chien, K.-Y., Lin, K.-J., Yeh, T.-H., Cheng, Y.-P., Lu, C.-S., and Wang, H.-L. (2012). (G2019S) LRRK2 activates MKK4-JNK pathway and causes degeneration of SN dopaminergic neurons in a transgenic mouse model of PD. *Cell Death Differ.* 19, 1623–1633.
- Chen, R.H.C., Wislet-Gendebien, S., Samuel, F., Visanji, N.P., Zhang, G., Marsilio, D., Langman, T., Fraser, P.E., and Tandon, A. (2013). α -Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *J. Biol. Chem.* 288, 7438–7449.
- Chesselet, M.-F., and Richter, F. (2011). Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol.* 10, 1108–1118.
- Chiba, K., Trevor, A., and Castagnoli, N. (1984). Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 574–578.
- 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.

- Choi, H.G., Zhang, J., Deng, X., Hatcher, J.M., Patricelli, M.P., Zhao, Z., Alessi, D.R., and Gray, N.S. (2012). Brain Penetrant LRRK2 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* *3*, 658–662.
- Choi, H.J., Kim, S.W., Lee, S.Y., and Hwang, O. (2003). Dopamine-dependent cytotoxicity of tetrahydrobiopterin: a possible mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *86*, 143–152.
- Chu, D., Thistlethwaite, P., Sullivan, C., Grifman, M., and Weitzman, M. (2004). Gene Delivery to the Mammalian Heart Using AAV Vectors. In *Gene Delivery to Mammalian Cells*, W. Heiser, ed. (Humana Press), pp. 213–224.
- Chung, C.Y., Koprach, J.B., Siddiqi, H., and Isacson, O. (2009). Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 3365–3373.
- Cirnaru, M.D., Marte, A., Belluzzi, E., Russo, I., Gabrielli, M., Longo, F., Arcuri, L., Murru, L., Bubacco, L., Matteoli, M., et al. (2014). LRRK2 kinase activity regulates synaptic vesicle trafficking and neurotransmitter release through modulation of LRRK2 macro-molecular complex. *Front. Mol. Neurosci.* *7*.
- Civiero, L., Vancaenenbroeck, R., Belluzzi, E., Beilina, A., Lobbstaël, E., Reyniers, L., Gao, F., Micetic, I., De Maeyer, M., Bubacco, L., et al. (2012). Biochemical Characterization of Highly Purified Leucine-Rich Repeat Kinases 1 and 2 Demonstrates Formation of Homodimers. *PLoS ONE* *7*.
- Connolly, B.S., and Lang, A.E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* *311*, 1670–1683.
- Cookson, M.R., Hardy, J., and Lewis, P.A. (2008). Genetic neuropathology of Parkinson's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *1*, 217–231.
- Cooper, O., Seo, H., Andrabi, S., Guardia-Laguarta, C., Graziotto, J., Sundberg, M., McLean, J.R., Carrillo-Reid, L., Xie, Z., Osborn, T., et al. (2012). Familial Parkinson's disease iPSCs show cellular deficits in mitochondrial responses that can be pharmacologically rescued. *Sci. Transl. Med.* *4*, 141ra90.
- Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiol. Rev.* *91*, 1161–1218.
- 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 α -synuclein transgenic mouse model are independent of LRRK2. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2420–2431.
- Daher, J.P.L., Volpicelli-Daley, L.A., Blackburn, J.P., Moehle, M.S., and West, A.B. (2014). Abrogation of α -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 9289–9294.

- 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 α -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* *290*, 19433–19444.
- Dalfó, E., Gómez-Isla, T., Rosa, J.L., Nieto Bodelón, M., Cuadrado Tejedor, M., Barrachina, M., Ambrosio, S., and Ferrer, I. (2004). Abnormal alpha-synuclein interactions with Rab proteins in alpha-synuclein A30P transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 302–313.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., and Javoy-Agid, F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* *52*, 1–6.
- D'Andrea, M.R., Ilyin, S., and Plata-Salaman, C.R. (2001). Abnormal patterns of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunolabeling in neuronal nuclei and Lewy bodies in Parkinson's disease substantia nigra brain tissues. *Neurosci. Lett.* *306*, 137–140.
- Danielson, S.R., Held, J.M., Schilling, B., Oo, M., Gibson, B.W., and Andersen, J.K. (2009). Preferentially increased nitration of alpha-synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease. *Anal. Chem.* *81*, 7823–7828.
- Danzer, K.M., Ruf, W.P., Putcha, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2011). Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J.* *25*, 326–336.
- Dawson, T.M., Ko, H.S., and Dawson, V.L. (2010). Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron* *66*, 646–661.
- Dehay, B., and Fernagut, P.-O. (2016). Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* *172*, 371–378.
- DeLong, M., and Wichmann, T. (2010). Changing Views of Basal Ganglia Circuits and Circuit Disorders. *Clin. EEG Neurosci.* *41*, 61–67.
- DeLong, M.R., and Wichmann, T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch. Neurol.* *64*, 20–24.
- Deng, J., Lewis, P.A., Greggio, E., Sluch, E., Beilina, A., and Cookson, M.R. (2008). Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1499–1504.
- Deng, X., Dzamko, N., Prescott, A., Davies, P., Liu, Q., Yang, Q., Lee, J.-D., Patricelli, M.P., Nomanbhoy, T.K., Alessi, D.R., et al. (2011). Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 203–205.
- Derkinderen, P., Rouaud, T., Lebouvier, T., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and De Giorgio, R. (2011). Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology* *77*, 1761–1767.

- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* **283**, 9089–9100.
- Di Fonzo, A., Wu-Chou, Y.-H., Lu, C.-S., van Doeselaar, M., Simons, E.J., Rohé, C.F., Chang, H.-C., Chen, R.-S., Weng, Y.-H., Vanacore, N., et al. (2006). A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics* **7**, 133–138.
- Dikiy, I., and Eliezer, D. (2014). N-terminal Acetylation Stabilizes N-terminal Helicity in Lipid- and Micelle-bound α -Synuclein and Increases Its Affinity for Physiological Membranes. *J. Biol. Chem.* **289**, 3652–3665.
- Dinter, E., Saridaki, T., Nippold, M., Plum, S., Diederichs, L., Komnig, D., Fensky, L., May, C., Marcus, K., Voigt, A., et al. (2016). Rab7 induces clearance of α -synuclein aggregates. *J. Neurochem.* **138**, 758–774.
- Doggett, E.A., Zhao, J., Mork, C.N., Hu, D., and Nichols, R.J. (2012). Phosphorylation of LRRK2 serines 955 and 973 is disrupted by Parkinson's disease mutations and LRRK2 pharmacological inhibition. *J. Neurochem.* **120**, 37–45.
- Doty, R.L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 329–339.
- Drolet, R.E., Sanders, J.M., and Kern, J.T. (2011). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Cellular Biology: A Review of Recent Advances in Identifying Physiological Substrates and Cellular Functions. *J. Neurogenet.* **25**, 140–151.
- Duda, J.E., Giasson, B.I., Mabon, M.E., Miller, D.C., Golbe, L.I., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2002). Concurrence of α -synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **104**, 7–11.
- 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 Ser910/Ser935, disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochem. J.* **430**, 405–413.
- Dzamko, N., Inesta-Vaquera, F., Zhang, J., Xie, C., Cai, H., Arthur, S., Tan, L., Choi, H., Gray, N., Cohen, P., et al. (2012). The I κ B Kinase Family Phosphorylates the Parkinson's Disease Kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-Like Receptor Signaling. *PLOS ONE* **7**, e39132.
- Dzamko, N., Chua, G., Ranola, M., Rowe, D.B., and Halliday, G.M. (2013). Measurement of LRRK2 and Ser910/935 phosphorylated LRRK2 in peripheral blood mononuclear cells from idiopathic Parkinson's disease patients. *J. Park. Dis.* **3**, 145–152.
- Dzamko, N., Zhou, J., Huang, Y., and Halliday, G.M. (2014). Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* **7**.

El-Agnaf, O.M.A., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Gibson, M.J., Curran, M.D., Court, J.A., Mann, D.M.A., Ikeda, S., et al. (2003). Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1945–1947.

Emborg, M.E. (2004). Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J. Neurosci. Methods* *139*, 121–143.

Emborg, M.E. (2007). Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease. *ILAR J.* *48*, 339–355.

Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010). Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 6838–6851.

Esteves, A.R., Swerdlow, R.H., and Cardoso, S.M. (2014). LRRK2, a puzzling protein: Insights into Parkinson's disease pathogenesis. *Exp. Neurol.* *261*, 206–216.

Estrada, A.A., Chan, B.K., Baker-Glenn, C., Beresford, A., Burdick, D.J., Chambers, M., Chen, H., Dominguez, S.L., Dotson, J., Drummond, J., et al. (2014). Discovery of highly potent, selective, and brain-penetrant aminopyrazole leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) small molecule inhibitors. *J. Med. Chem.* *57*, 921–936.

Faggiani, E., and Benazzouz, A. (2016). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: From history to the interaction with the monoaminergic systems. *Prog. Neurobiol.*

Fell, M.J., Mirescu, C., Basu, K., Cheewatrakoolpong, B., DeMong, D.E., Ellis, J.M., Hyde, L.A., Lin, Y., Markgraf, C.G., Mei, H., et al. (2015). MLI-2, a Potent, Selective, and Centrally Active Compound for Exploring the Therapeutic Potential and Safety of LRRK2 Kinase Inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *355*, 397–409.

Fox, S.H., Katzenschlager, R., Lim, S.-Y., Ravina, B., Seppi, K., Coelho, M., Poewe, W., Rascol, O., Goetz, C.G., and Sampaio, C. (2011). The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *26 Suppl 3*, S2-41.

Francelle, L., Galvan, L., and Brouillet, E. (2014). Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 295.

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.

Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., et al. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *344*, 710–719.

Freundt, E.C., Maynard, N., Clancy, E.K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., and Brahic, M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* *72*, 517–524.

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

Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., and Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol.* *51*, 296–301.

Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S., and Obata, F. (2005). An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann. Neurol.* *57*, 918–921.

Fung, H.-C., Chen, C.-M., Hardy, J., Singleton, A.B., and Wu, Y.-R. (2006). A common genetic factor for Parkinson disease in ethnic Chinese population in Taiwan. *BMC Neurol.* *6*, 47.

Gai, W.P., Blumbergs, P.C., and Blessing, W.W. (1995). Microtubule-associated protein 5 is a component of Lewy bodies and Lewy neurites in the brainstem and forebrain regions affected in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *91*, 78–81.

Galter, D., Westerlund, M., Carmine, A., Lindqvist, E., Sydow, O., and Olson, L. (2006). LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. *Ann. Neurol.* *59*, 714–719.

Gandhi, P.N., Chen, S.G., and Wilson-Delfosse, A.L. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* *87*, 1283–1295.

Garcia-Miralles, M., Coomaraswamy, J., Häbig, K., Herzig, M.C., Funk, N., Gillardon, F., Maisel, M., Jucker, M., Gasser, T., Galter, D., et al. (2015). No Dopamine Cell Loss or Changes in Cytoskeleton Function in Transgenic Mice Expressing Physiological Levels of Wild Type or G2019S Mutant LRRK2 and in Human Fibroblasts. *PLoS ONE* *10*.

Gaspar, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M., and Wittinghofer, A. (2009). It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 423–429.

Gatto, E.M., Parisi, V., Converso, D.P., Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Martí-Massó, J.F., and Paisán-Ruiz, C. (2013). The LRRK2 G2019S mutation in a series of Argentinean patients with Parkinson's disease: clinical and demographic characteristics. *Neurosci. Lett.* *537*, 1–5.

Gautier, C.A., Corti, O., and Brice, A. (2014). Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* *170*, 339–343.

George, J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* *3*, REVIEWS3002.

- Gerfen, C.R., and Surmeier, D.J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441–466.
- Ghosh, D., Sahay, S., Ranjan, P., Salot, S., Mohite, G.M., Singh, P.K., Dwivedi, S., Carvalho, E., Banerjee, R., Kumar, A., et al. (2014). The Newly Discovered Parkinson's Disease Associated Finnish Mutation (A53E) Attenuates α -Synuclein Aggregation and Membrane Binding. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 6419–6421.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985–989.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 2380–2386.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Quinn, S.M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2002). Neuronal α -Synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human α -Synuclein. *Neuron* 34, 521–533.
- Giasson, B.I., Forman, M.S., Higuchi, M., Golbe, L.I., Graves, C.L., Kotzbauer, P.T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300, 636–640.
- 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.
- Gillardot, F. (2009). Interaction of elongation factor 1-alpha with leucine-rich repeat kinase 2 impairs kinase activity and microtubule bundling in vitro. *Neuroscience* 163, 533–539.
- Gilsbach, B.K., and Kortholt, A. (2014). Structural biology of the LRRK2 GTPase and kinase domains: implications for regulation. *Front. Mol. Neurosci.* 7.
- Gilsbach, B.K., Ho, F.Y., Vetter, I.R., van Haastert, P.J.M., Wittinghofer, A., and Kortholt, A. (2012). Roco kinase structures give insights into the mechanism of Parkinson disease-related leucine-rich-repeat kinase 2 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10322–10327.
- Giovanni, A., Sonsalla, P.K., and Heikkila, R.E. (1994). Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 1008–1014.
- Gispert, S., Turco, D.D., Garrett, L., Chen, A., Bernard, D.J., Hamm-Clement, J., Korf, H.-W., Deller, T., Braak, H., Auburger, G., et al. (2003). Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 419–429.

Gloeckner, C.J., Kinkl, N., Schumacher, A., Braun, R.J., O'Neill, E., Meitinger, T., Kolch, W., Prokisch, H., and Ueffing, M. (2006). The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 223–232.

Gloeckner, C.J., Schumacher, A., Boldt, K., and Ueffing, M. (2009). The Parkinson disease-associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro. *J. Neurochem.* *109*, 959–968.

Gloeckner, C.J., Boldt, K., von Zweydford, F., Helm, S., Wiesent, L., Sarioglu, H., and 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. *J. Proteome Res.* *9*, 1738–1745.

Godena, V.K., Brookes-Hocking, N., Moller, A., Shaw, G., Oswald, M., Sancho, R.M., Miller, C.C.J., Whitworth, A.J., and De Vos, K.J. (2014). Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat. Commun.* *5*, 5245.

Golovko, M.Y., Rosenberger, T.A., Feddersen, S., Færgeman, N.J., and Murphy, E.J. (2007). α -Synuclein gene ablation increases docosahexaenoic acid incorporation and turnover in brain phospholipids. *J. Neurochem.* *101*, 201–211.

Gombash, S.E., Manfredsson, F.P., Kemp, C.J., Kuhn, N.C., Fleming, S.M., Egan, A.E., Grant, L.M., Ciucci, M.R., MacKeigan, J.P., and Sortwell, C.E. (2013). Morphological and Behavioral Impact of AAV2/5-Mediated Overexpression of Human Wildtype Alpha-Synuclein in the Rat Nigrostriatal System. *PLOS ONE* *8*, e81426.

Gómez-Suaga, P., Fdez, E., Fernández, B., Martínez-Salvador, M., Blanca Ramírez, M., Madero-Pérez, J., Rivero-Ríos, P., Fuentes, J.M., and Hilfiker, S. (2014). Novel insights into the neurobiology underlying LRRK2-linked Parkinson's disease. *Neuropharmacology* *85*, 45–56.

Gómez-Tortosa, E., Newell, K., Irizarry, M.C., Sanders, J.L., and Hyman, B.T. (2000). alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *99*, 352–357.

Gonçalves, S., and Outeiro, T.F. (2013). Assessing the Subcellular Dynamics of Alpha-synuclein Using Photoactivation Microscopy. *Mol. Neurobiol.* *47*, 1081–1092.

Göring, S., Taymans, J.-M., Baekelandt, V., and Schmidt, B. (2014). Indolinone based LRRK2 kinase inhibitors with a key hydrogen bond. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *24*, 4630–4637.

Graham, D.G. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* *14*, 633–643.

Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., and Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* *265*, 1826–1831.

Greggio, E., and Cookson, M.R. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three questions. *ASN NEURO* *1*.

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.

Greggio, E., Zambrano, I., Kaganovich, A., Beilina, A., Taymans, J.-M., Daniëls, V., Lewis, P., Jain, S., Ding, J., Syed, A., et al. (2008). The Parkinson Disease-associated Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* *283*, 16906–16914.

Guerreiro, P.S., Huang, Y., Gysbers, A., Cheng, D., Gai, W.P., Outeiro, T.F., and Halliday, G.M. (2013). LRRK2 interactions with α -synuclein in Parkinson's disease brains and in cell models. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *91*, 513–522.

Guo, J.T., Chen, A.Q., Kong, Q., Zhu, H., Ma, C.M., and Qin, C. (2008). Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in alpha-synuclein stably transfected SH-SY5Y cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* *28*, 35–47.

Häbig, K., Walter, M., Poths, S., Riess, O., and Bonin, M. (2008). RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics* *9*, 83–94.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* *219*, 1–14.

Hamlin, C., Puoti, G., Berri, S., Sting, E., Harris, C., Cohen, M., Spear, C., Bizzi, A., Debanne, S.M., and Rowland, D.Y. (2012). A comparison of tau and 14-3-3 protein in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* *79*, 547–552.

Hargrove, P.W., Kepes, S., Hanawa, H., Obenauer, J.C., Pei, D., Cheng, C., Gray, J.T., Neale, G., and Persons, D.A. (2008). Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 525–533.

Hasegawa, K., Stoessl, A.J., Yokoyama, T., Kowa, H., Wszolek, Z.K., and Yagishita, S. (2009). Familial Parkinsonism: Study of Original Sagami-hara PARK8 (I2020T) Kindred With Variable Clinicopathologic Outcomes. *Parkinsonism Relat. Disord.* *15*, 300–306.

Hatano, T., Kubo, S., Imai, S., Maeda, M., Ishikawa, K., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2007). Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 678–690.

Hatcher, J.M., Zhang, J., Choi, H.G., Ito, G., Alessi, D.R., and Gray, N.S. (2015). Discovery of a Pyrrolopyrimidine (JH-II-127), a Highly Potent, Selective, and Brain Penetrant LRRK2 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* *6*, 584–589.

Haugarvoll, K., Rademakers, R., Kachergus, J.M., Nuytemans, K., Ross, O.A., Gibson, J.M., Tan, E.-K., Gaig, C., Tolosa, E., Goldwurm, S., et al. (2008). Lrrk2 R1441C parkinsonism is clinically similar to sporadic Parkinson disease. *Neurology* *70*, 1456–1460.

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. (2008a). Phenotype, genotype, and worldwide genetic

penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 7, 583–590.

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. (2008b). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 7, 583–590.

Hellström, M., Ruitenberg, M.J., Pollett, M.A., Ehlert, E.M.E., Twisk, J., Verhaagen, J., and Harvey, A.R. (2008). Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. *Gene Ther.* 16, 521–532.

Henderson, J.L., Kormos, B.L., Hayward, M.M., Coffman, K.J., Jasti, J., Kurumbail, R.G., Wager, T.T., Verhoest, P.R., Noell, G.S., Chen, Y., et al. (2015). Discovery and preclinical profiling of 3-[4-(morpholin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]benzotrile (PF-06447475), a highly potent, selective, brain penetrant, and in vivo active LRRK2 kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* 58, 419–432.

Hertzman, C., Wiens, M., Bowering, D., Snow, B., and Calne, D. (1990). Parkinson's disease: A case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am. J. Ind. Med.* 17, 349–355.

Herzig, M.C., Bidinosti, M., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmlen, 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.

Hickey, P., and Stacy, M. (2013). AAV2-neurturin (CERE-120) for Parkinson's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 13, 137–145.

Higashi, S., Biskup, S., West, A.B., Trinkaus, D., Dawson, V.L., Faull, R.L.M., Waldvogel, H.J., Arai, H., Dawson, T.M., Moore, D.J., et al. (2007). Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Res.* 1155, 208–219.

Hirsch, E.C., Vyas, S., and Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, *Supplement 1*, S210–S212.

Hodara, R., Norris, E.H., Giasson, B.I., Mishizen-Eberz, A.J., Lynch, D.R., Lee, V.M.-Y., and Ischiropoulos, H. (2004). Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J. Biol. Chem.* 279, 47746–47753.

Hoehn, M.M., and Yahr, M.D. (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17, 427–442.

Höglinger, G.U., Féger, J., Prigent, A., Michel, P.P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W.H., and Hirsch, E.C. (2003). Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J. Neurochem.* 84, 491–502.

Howarth, J.L., Lee, Y.B., and Uney, J.B. (2010). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol. Toxicol.* *26*, 1–20.

Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., and Jovin, T.M. (2004). Impact of the Acidic C-Terminal Region Comprising Amino Acids 109–140 on α -Synuclein Aggregation in Vitro. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 16233–16242.

Hudkins, R.L., Diebold, J.L., Tao, M., Josef, K.A., Park, C.H., Angeles, T.S., Aimone, L.D., Husten, J., Ator, M.A., Meyer, S.L., et al. (2008). Mixed-lineage kinase 1 and mixed-lineage kinase 3 subtype-selective dihydronaphthyl[3,4-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5-ones: optimization, mixed-lineage kinase 1 crystallography, and oral in vivo activity in 1-methyl-4-phenyltetrahydropyridine models. *J. Med. Chem.* *51*, 5680–5689.

Ito, G., and Iwatsubo, T. (2012). Re-examination of the dimerization state of leucine-rich repeat kinase 2: predominance of the monomeric form. *Biochem. J.* *441*, 987–998.

Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T., and Iwatsubo, T. (2007). GTP Binding Is Essential to the Protein Kinase Activity of LRRK2, a Causative Gene Product for Familial Parkinson's Disease. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 1380–1388.

Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M., and Sobue, G. (2003). *Dorfin* Localizes to Lewy Bodies and Ubiquitylates Synphilin-1. *J. Biol. Chem.* *278*, 29106–29114.

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.

Iyer, A., Roeters, S.J., Schilderink, N., Hommersom, B., Heeren, R.M.A., Woutersen, S., Claessens, M.M.A.E., and Subramaniam, V. (2016). The Impact of N-terminal Acetylation of α -Synuclein on Phospholipid Membrane Binding and Fibril Structure. *J. Biol. Chem.* *291*, 21110–21122.

Jagmag, S.A., Tripathi, N., Shukla, S.D., Maiti, S., and Khurana, S. (2016). Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.* *9*.

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.

Jang, A., Lee, H.-J., Suk, J.-E., Jung, J.-W., Kim, K.-P., and Lee, S.-J. (2010). Non-classical exocytosis of α -synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J. Neurochem.* *113*, 1263–1274.

Jarraya, B., Boulet, S., Ralph, G.S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., Miskin, J.E., Shin, M., Delzescaux, T., Drouot, X., et al. (2009). Dopamine Gene Therapy for Parkinson's Disease in a Nonhuman Primate Without Associated Dyskinesia. *Sci. Transl. Med.* *1*, 2ra4-2ra4.

Jensen, P.H., Hager, H., Nielsen, M.S., Højrup, P., Gliemann, J., and Jakes, R. (1999). α -Synuclein Binds to Tau and Stimulates the Protein Kinase A-catalyzed Tau Phosphorylation of Serine Residues 262 and 356. *J. Biol. Chem.* *274*, 25481–25489.

Jensen, P.H., Islam, K., Kenney, J., Nielsen, M.S., Power, J., and Gai, W.P. (2000). Microtubule-associated Protein 1B Is a Component of Cortical Lewy Bodies and Binds α -Synuclein Filaments. *J. Biol. Chem.* *275*, 21500–21507.

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*.

Jucker, M., and Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* *501*, 45–51.

Kachergus, J., Mata, I.F., Hulihan, M., Taylor, J.P., Lincoln, S., Aasly, J., Gibson, J.M., Ross, O.A., Lynch, T., Wiley, J., et al. (2005). Identification of a Novel LRRK2 Mutation Linked to Autosomal Dominant Parkinsonism: Evidence of a Common Founder across European Populations. *Am. J. Hum. Genet.* *76*, 672–680.

Kamikawaji, S., Ito, G., and Iwatsubo, T. (2009). Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 10963–10975.

Kawakami, F., Yabata, T., Ohta, E., Maekawa, T., Shimada, N., Suzuki, M., Maruyama, H., Ichikawa, T., and Obata, F. (2012). LRRK2 Phosphorylates Tubulin-Associated Tau but Not the Free Molecule: LRRK2-Mediated Regulation of the Tau-Tubulin Association and Neurite Outgrowth. *PLoS ONE* *7*.

Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., Honjyo, Y., Shibasaki, H., and Budka, H. (2002). 14-3-3 Proteins in Lewy Bodies in Parkinson Disease and Diffuse Lewy Body Disease Brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 245–253.

Khan, N.L., Jain, S., Lynch, J.M., Pavese, N., Abou-Sleiman, P., Holton, J.L., Healy, D.G., Gilks, W.P., Sweeney, M.G., Ganguly, M., et al. (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.

Kiely, A.P., Asi, Y.T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A.J., Hardy, J., et al. (2013). α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol. (Berl.)* *125*, 753–769.

Kim, B., Yang, M.-S., Choi, D., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Seol, W., Choi, S., Jou, I., Kim, E.-Y., and Joe, E. (2012a). Impaired Inflammatory Responses in Murine Lrrk2-Knockdown Brain Microglia. *PLoS ONE* *7*.

Kim, B., Yang, M.-S., Choi, D., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Seol, W., Choi, S., Jou, I., Kim, E.-Y., and Joe, E. (2012b). Impaired Inflammatory Responses in Murine Lrrk2-Knockdown Brain Microglia. *PLoS ONE* *7*.

Kimbrough, R.D., and Gaines, T.B. (1970). Toxicity of paraquat to rats and its effect on rat lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *17*, 679–690.

Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T.E., Muzyczka, N., Mandel, R.J., and Björklund, A. (2002). Parkinson-Like Neurodegeneration Induced by Targeted Overexpression of α -Synuclein in the Nigrostriatal System. *J. Neurosci.* *22*, 2780–2791.

Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995). Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *5*, 409–416.

Koprach, J.B., Johnston, T.H., Reyes, M.G., Sun, X., and Brotchie, J.M. (2010). Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* *5*, 43.

Korr, D., Toschi, L., Donner, P., Pohlenz, H.-D., Kreft, B., and Weiss, B. (2006). LRRK1 protein kinase activity is stimulated upon binding of GTP to its Roc domain. *Cell. Signal.* *18*, 910–920.

Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., and Riess, O. (1998). AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* *18*, 106–108.

Kügler, S., Meyn, L., Holzmüller, H., Gerhardt, E., Isenmann, S., Schulz, J.B., and Bähr, M. (2001). Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. *Mol. Cell. Neurosci.* *17*, 78–96.

Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., and Sutton, R.E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* *12*, 1893–1905.

Kuo, Y.-M., Li, Z., Jiao, Y., Gaborit, N., Pani, A.K., Orrison, B.M., Bruneau, B.G., Giasson, B.I., Smeyne, R.J., Gershon, M.D., et al. (2010). Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated α -synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1633–1650.

Kuusisto, E., Salminen, A., and Alafuzoff, I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* *12*, 2085–2090.

Kuwahara, T., Inoue, K., D'Agati, V.D., Fujimoto, T., Eguchi, T., Saha, S., Wolozin, B., Iwatsubo, T., and Abeliovich, A. (2016). LRRK2 and RAB7L1 coordinately regulate axonal morphology and lysosome integrity in diverse cellular contexts. *Sci. Rep.* *6*, 29945.

Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* *219*, 979–980.

- 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.
- Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., and Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 38–48.
- Law, B.M.H., Spain, V.A., Leinster, V.H.L., Chia, R., Beilina, A., Cho, H.J., Taymans, J.-M., Urban, M.K., Sancho, R.M., Blanca Ramírez, M., et al. (2014). A direct interaction between leucine-rich repeat kinase 2 and specific β -tubulin isoforms regulates tubulin acetylation. *J. Biol. Chem.* 289, 895–908.
- Le, W., Wu, J., and Tang, Y. (2016). Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 9.
- Le Gal La Salle, G., Robert, J.J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L.D., Perricaudet, M., and Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259, 988–990.
- Lee, J.S., and Lee, S.-J. (2016). Mechanism of Anti- α -Synuclein Immunotherapy. *J. Mov. Disord.* 9, 14–19.
- 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. (2010a). Inhibitors of Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Protect Against LRRK2-Models of Parkinson's Disease. *Nat. Med.* 16, 998–1000.
- Lee, B.D., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2012). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) as a potential therapeutic target in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 365–373.
- Lee, H.-J., Patel, S., and Lee, S.-J. (2005). Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6016–6024.
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Bae, E.-J., Lee, J.-H., Paik, S.R., and Lee, S.-J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1835–1849.
- 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.
- Lee, M.K., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, A.S., Dawson, T.M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Price, D.L. (2002). Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 \rightarrow Thr mutation causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8968–8973.
- Lee, S.-J., Desplats, P., Sigurdson, C., Tsigelny, I., and Masliah, E. (2010b). Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 702–706.
- Lewis, P.A. (2009). The function of ROCO proteins in health and disease. *Biol. Cell* 101, 183–191.

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.

Li, C., and Beal, M.F. (2005). Leucine-rich repeat kinase 2: A new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16535–16536.

Li, D., and Roberts, R. (2001). Human Genome and Diseases: ¶WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 2085–2097.

Li, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 11604–11613.

Li, J.-Q., Tan, L., and Yu, J.-T. (2014). The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. *Mol. Neurodegener.* 9.

Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Marsh, L., Dawson, T.M., Jäkälä, P., Hartmann, T., Price, D.L., et al. (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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2162–2167.

Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., van Westen, D., Lätt, J., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., et al. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 6544–6549.

Li, X., Patel, J.C., Wang, J., Avshalumov, M.V., Nicholson, C., Buxbaum, J.D., Elder, G.A., Rice, M.E., and Yue, Z. (2010). Enhanced Striatal Dopamine Transmission and Motor Performance with LRRK2 Overexpression in Mice is Eliminated by familial Parkinson's Disease Mutation G2019S. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 1788–1797.

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. (2009a). Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron* 64, 807–827.

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. (2009b). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates the Progression of Neuropathology Induced by Parkinson's-Disease-Related Mutant α -synuclein. *Neuron* 64, 807–827.

Lin, X., Parisiadou, L., Sgobio, C., Liu, G., Yu, J., Sun, L., Shim, H., Gu, X.-L., Luo, J., Long, C.-X., et al. (2012). Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant α -synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of

transcription factor nuclear receptor related 1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 9248–9264.

Lindvall, O., Sawle, G., Widner, H., Rothwell, J.C., Björklund, A., Brooks, D., Brundin, P., Frackowiak, R., Marsden, C.D., and Odin, P. (1994). Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 35, 172–180.

Liou, H.H., Tsai, M.C., Chen, C.J., Jeng, J.S., Chang, Y.C., Chen, S.Y., and Chen, R.C. (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease A case-control study in Taiwan. *Neurology* 48, 1583–1588.

Liu, C.-W., Giasson, B.I., Lewis, K.A., Lee, V.M., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (2005). A Precipitating Role for Truncated α -Synuclein and the Proteasome in α -Synuclein Aggregation IMPLICATIONS FOR PATHOGENESIS OF PARKINSON DISEASE. *J. Biol. Chem.* 280, 22670–22678.

Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Uéda, K., Chan, P., and Yu, S. (2009a). α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* 454, 187–192.

Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Uéda, K., Chan, P., and Yu, S. (2009b). α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* 454, 187–192.

Liu, Y., Qiang, M., Wei, Y., and He, R. (2011). A novel molecular mechanism for nitrated α -synuclein-induced cell death. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 239–249.

Lo Bianco, C., Ridet, J.-L., Schneider, B.L., Déglon, N., and Aebischer, P. (2002). α -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10813–10818.

Lobbestael, E., Baekelandt, V., and Taymans, J.-M. (2012). Phosphorylation of LRRK2: from kinase to substrate. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1102–1110.

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.

Loeb, V., Yakunin, E., Saada, A., and Sharon, R. (2010). The transgenic overexpression of α -synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition. *J. Biol. Chem.* 285, 7334–7343.

Looyenga, B.D., Furge, K.A., Dykema, K.J., Koeman, J., Swiatek, P.J., Giordano, T.J., West, A.B., Resau, J.H., Teh, B.T., and MacKeigan, J.P. (2011). Chromosomal amplification of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) is required for oncogenic MET signaling in papillary renal and thyroid carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1439–1444.

Lotharius, J., and Brundin, P. (2002). Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 932–942.

Lou, H., Montoya, S.E., Alerte, T.N.M., Wang, J., Wu, J., Peng, X., Hong, C.-S., Friedrich, E.E., Mader, S.A., Pedersen, C.J., et al. (2010). Serine 129 Phosphorylation Reduces the Ability of α -Synuclein to Regulate Tyrosine Hydroxylase and Protein Phosphatase 2A in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 17648–17661.

Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2012a). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953.

Luk, K.C., Kehm, V.M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2012b). Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.* 209, 975–986.

Luthman, J., Fredriksson, A., Lewander, T., Jonsson, G., and Archer, T. (1989). Effects of d-amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 99, 550–557.

Ma, B., Xu, L., Pan, X., Sun, L., Ding, J., Xie, C., Koliatsos, V.E., and Cai, H. (2016). LRRK2 modulates microglial activity through regulation of chemokine (C-X3-C) receptor 1 – mediated signalling pathways. *Hum. Mol. Genet.* ddw194.

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.

Maingay, M., Romero-Ramos, M., Carta, M., and Kirik, D. (2006). Ventral tegmental area dopamine neurons are resistant to human mutant alpha-synuclein overexpression. *Neurobiol. Dis.* 23, 522–532.

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.

Mandler, M., Valera, E., Rockenstein, E., Weninger, H., Patrick, C., Adame, A., Santic, R., Meindl, S., Vigil, B., Smrzka, O., et al. (2014). Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 127, 861–879.

Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 9, 187–192.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912–1934.

- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., and Di Monte, D.A. (2002). The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *277*, 1641–1644.
- Marín, I. (2006). The Parkinson Disease Gene LRRK2: Evolutionary and Structural Insights. *Mol. Biol. Evol.* *23*, 2423–2433.
- 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.
- Martí-Massó, J.-F., Ruiz-Martínez, J., Bolaño, M.J., Ruiz, I., Gorostidi, A., Moreno, F., Ferrer, I., and López de Munain, A. (2009). Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *24*, 1998–2001.
- Martín, E.D., González-García, C., Milán, M., Fariñas, I., and Ceña, V. (2004). Stressor-related impairment of synaptic transmission in hippocampal slices from α -synuclein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 3085–3091.
- 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 α -Synuclein Transgenic Mice Develop Neuronal Mitochondrial Degeneration and Cell Death. *J. Neurosci.* *26*, 41–50.
- Martinez-Vicente, M., and Cuervo, A.M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* *6*, 352–361.
- Maskri, L., Zhu, X., Fritzen, S., Kühn, K., Ullmer, C., Engels, P., Andriske, M., Stichel, C.C., and Lübbert, H. (2005). Influence of Different Promoters on the Expression Pattern of Mutated Human α -Synuclein in Transgenic Mice. *Neurodegener. Dis.* *1*, 255–265.
- Maslah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., and Mucke, L. (2000). Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in α -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Science* *287*, 1265–1269.
- Maslah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., et al. (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* *46*, 857–868.
- Maslah, E., Rockenstein, E., Mante, M., Crews, L., Spencer, B., Adame, A., Patrick, C., Trejo, M., Ubhi, K., Rohn, T.T., et al. (2011). Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One* *6*, e19338.
- Matsuoka, Y., Vila, M., Lincoln, S., McCormack, A., Picciano, M., LaFrancois, J., Yu, X., Dickson, D., Langston, W.J., McGowan, E., et al. (2001). Lack of Nigral Pathology in Transgenic Mice Expressing Human α -Synuclein Driven by the Tyrosine Hydroxylase Promoter. *Neurobiol. Dis.* *8*, 535–539.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285–1291.

McNaught, K.S., and Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 297, 191–194.

Meixner, A., Boldt, K., Van Troys, M., Askenazi, M., Gloeckner, C.J., Bauer, M., Marto, J.A., Ampe, C., Kinkl, N., and Ueffing, M. (2011). A QUICK screen for Lrrk2 interaction partners--leucine-rich repeat kinase 2 is involved in actin cytoskeleton dynamics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M110.001172.

Melki, R. (2015). Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases. *J. Park. Dis.* 5, 217–227.

Melrose, H.L., Dächsel, J.C., Behrouz, B., Lincoln, S.J., Yue, M., Hinkle, K.M., Kent, C., Korvatska, E., Taylor, J.P., Witten, L., et al. (2010). Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 40, 503–517.

Michaely, P., Tomchick, D.R., Machius, M., and Anderson, R.G.W. (2002). Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *EMBO J.* 21, 6387–6396.

Michel, P.P., Hirsch, E.C., and Hunot, S. (2016). Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* 90, 675–691.

Mikhail, F., Calingasan, N., Parolari, L., Subramanian, A., Yang, L., and Flint Beal, M. (2015). Lack of exacerbation of neurodegeneration in a double transgenic mouse model of mutant LRRK2 and tau. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3545–3556.

Miklossy, J., Arai, T., Guo, J.-P., Klegeris, A., Yu, S., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2006). LRRK2 Expression in Normal and Pathologic Human Brain and in Human Cell Lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 953–963.

Mills, R.D., Mulhern, T.D., Cheng, H.-C., and Culvenor, J.G. (2012). Analysis of LRRK2 accessory repeat domains: prediction of repeat length, number and sites of Parkinson's disease mutations. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1086–1089.

Mink, J.W., and Thach, W.T. (1993). Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 950–957.

Moehle, M.S., Webber, P.J., Tse, T., Sukar, N., Standaert, D.G., DeSilva, T.M., Cowell, R.M., and West, A.B. (2012). LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 1602–1611.

Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J. Neural Transm.* 107, 335–341.

Mollenhauer, B., El-Agnaf, O.M.A., Marcus, K., Trenkwalder, C., and Schlossmacher, M.G. (2010). Quantification of α -synuclein in cerebrospinal fluid as a biomarker candidate: review of the literature and considerations for future studies. *Biomark. Med.* 4, 683–699.

Mortiboys, H., Johansen, K.K., Aasly, J.O., and Bandmann, O. (2010). Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. *Neurology* 75, 2017–2020.

Mortiboys, H., Furlong, R., Bronstad, G., Aasly, J., Elliott, C., and Bandmann, O. (2015). UDCA exerts beneficial effect on mitochondrial dysfunction in LRRK2 G2019S carriers and in vivo. *Neurology* 85, 846–852.

Mougenot, A.-L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., and Baron, T. (2012). Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 33, 2225–2228.

Murray, I.V.J., Giasson, B.I., Quinn, S.M., Koppaka, V., Axelsen, P.H., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2003). Role of α -Synuclein Carboxy-Terminus on Fibril Formation in Vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 8530–8540.

Nappi, A.J., Vass, E., Prota, G., and Memoli, S. (1995). The Effects of Hydroxyl Radical Attack on Dopa, Dopamine, 6-Hydroxydopa, and 6-Hydroxydopamine. *Pigment Cell Res.* 8, 283–293.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803.

Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2006). Mdv1 Interacts with Assembled Dnm1 to Promote Mitochondrial Division. *J. Biol. Chem.* 281, 2177–2183.

Negro, A., Brunati, A.M., Donella-Deana, A., Massimino, M.L., and Pinna, L.A. (2002). Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 210–212.

Neumann, M., Kahle, P.J., Giasson, B.I., Ozmen, L., Borroni, E., Spooen, W., Müller, V., Odoj, S., Fujiwara, H., Hasegawa, M., et al. (2002). Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies. *J. Clin. Invest.* 110, 1429–1439.

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.

Niu, J., Yu, M., Wang, C., and Xu, Z. (2012). Leucine-rich repeat kinase 2 disturbs mitochondrial dynamics via Dynamin-like protein: LRRK2 disturbs mitochondrial dynamics via DLP1. *J. Neurochem.* 122, 650–658.

Norris, E.H., Giasson, B.I., and Lee, V.M.-Y. (2004). α -Synuclein: Normal Function and Role in Neurodegenerative Diseases. B.-C.T. in D. Biology, ed. (Academic Press), pp. 17–54.

Olanow, C.W., Perl, D.P., DeMartino, G.N., and McNaught, K.S.P. (2004). Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol.* 3, 496–503.

Ono, K., Ikemoto, M., Kawarabayashi, T., Ikeda, M., Nishinakagawa, T., Hosokawa, M., Shoji, M., Takahashi, M., and Nakashima, M. (2009). A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyric acid, attenuates the pathogenic potency in human alpha-synuclein A30P + A53T transgenic mice. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 649–654.

Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., and Wolozin, B. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 5782–5791.

Oueslati, A. (2016). Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J. Park. Dis.* 6, 39–51.

Paik, S.R., Shin, H.J., Lee, J.H., Chang, C.S., and Kim, J. (1999). Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem. J.* 340 (Pt 3), 821–828.

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.

Paleologou, K.E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fernandez, C.O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W.P., et al. (2010). Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 3184–3198.

Palfi, S., Gurruchaga, J.M., Ralph, G.S., Lepetit, H., Lavisse, S., Buttery, P.C., Watts, C., Miskin, J., Kelleher, M., Deeley, S., et al. (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. *Lancet Lond. Engl.* 383, 1138–1146.

Papale, A., Cerovic, M., and Brambilla, R. (2009). Viral vector approaches to modify gene expression in the brain. *J. Neurosci. Methods* 185, 1–14.

Parisiadou, L., Xie, C., Cho, H.J., Lin, X., Gu, X.-L., Long, C.-X., Lobbestael, E., Baekelandt, V., Taymans, J.-M., Sun, L., et al. (2009). Phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins by LRRK2 promotes the rearrangement of actin cytoskeleton in neuronal morphogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13971–13980.

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.

Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). Novel α -synuclein mutation A53E associated with

atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* 35, 2180.e1-5.

Passini, M.A., Watson, D.J., and Wolfe, J.H. (2004). Gene delivery to the mouse brain with adeno-associated virus. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 246, 225–236.

Paumier, K.L., Luk, K.C., Manfredsson, F.P., Kanaan, N.M., Lipton, J.W., Collier, T.J., Steece-Collier, K., Kemp, C.J., Celano, S., Schulz, E., et al. (2015). Intrastratial injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol. Dis.* 82, 185–199.

Pchelina, S.N., Ivanova, O.N., Emel'ianov, A.K., and Iakimovskiĭ, A.F. (2011). [Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease]. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova* 111, 56–62.

Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., and Baekelandt, V. (2015). α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344.

Perez, R.G., Waymire, J.C., Lin, E., Liu, J.J., Guo, F., and Zigmond, M.J. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3090–3099.

Perry, G., Zhu, X., Babar, A.K., Siedlak, S.L., Yang, Q., Ito, G., Iwatsubo, T., Smith, M.A., and Chen, S.G. (2008). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Colocalizes with α -Synuclein in Parkinson's Disease, but Not Tau-Containing Deposits in Tauopathies. *Neurodegener. Dis.* 5, 222–224.

Petersen, K., Olesen, O.F., and Mikkelsen, J.D. (1999). Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91, 651–659.

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., Cirnaru, M.D., Kaiser, C.J.O., Jagtap, P., Kastenmüller, A., Pischedda, F., Marte, A., von Zweyendorf, 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.

Plowey, E.D., Cherra, S.J., Liu, Y.-J., and Chu, C.T. (2008). Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 105, 1048–1056.

Politis, M., Wu, K., Loane, C., Quinn, N.P., Brooks, D.J., Rehnacrona, S., Bjorklund, A., Lindvall, O., and Piccini, P. (2010). Serotonergic neurons mediate dyskinesia side effects in Parkinson's patients with neural transplants. *Sci. Transl. Med.* 2, 38ra46.

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 α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276, 2045–2047.

Porras, G., Li, Q., and Bezdard, E. (2012). Modeling Parkinson's Disease in Primates: The MPTP Model. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009308.

Proukakis, C., Houlden, H., and Schapira, A.H. (2013). Somatic alpha-synuclein mutations in Parkinson's disease: Hypothesis and preliminary data. *Mov. Disord.* 28, 705–712.

Przedborski, S., Chen, Q., Vila, M., Giasson, B.I., Djaldatti, R., Vukosavic, S., Souza, J.M., Jackson-Lewis, V., Lee, V.M.-Y., and Ischiropoulos, H. (2001). Oxidative post-translational modifications of α -synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 76, 637–640.

Puccini, J.M., Marker, D.F., Fitzgerald, T., Barbieri, J., Kim, C.S., Miller-Rhodes, P., Lu, S.-M., Dewhurst, S., and Gelbard, H.A. (2015). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Modulates Neuroinflammation and Neurotoxicity in Models of Human Immunodeficiency Virus 1-Associated Neurocognitive Disorders. *J. Neurosci.* 35, 5271–5283.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001). Circuits within the Basal Ganglia System.

Puschmann, A., Englund, E., Ross, O.A., Vilariño-Güell, C., Lincoln, S.J., Kachergus, J.M., Cobb, S.A., Törnqvist, A.-L., Rehncrona, S., Widner, H., et al. (2012). First neuropathological description of a patient with Parkinson's disease and LRRK2 p.N1437H mutation. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 332–338.

Putten, H. van der, Wiederhold, K.-H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Hofele, K., Spooren, W.P.J.M., Ruegg, M.A., et al. (2000). Neuropathology in Mice Expressing Human α -Synuclein. *J. Neurosci.* 20, 6021–6029.

Pyatigorskaya, N., Sharman, M., Corvol, J.-C., Valabregue, R., Yahia-Cherif, L., Poupon, F., Cormier-Dequaire, F., Siebner, H., Klebe, S., Vidailhet, M., et al. (2015). High nigral iron deposition in LRRK2 and Parkin mutation carriers using R2* relaxometry. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 1077–1084.

Qing, H., Wong, W., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2009). Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 149–152.

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.

Ramsden, N., Perrin, J., Ren, Z., Lee, B.D., Zinn, N., Dawson, V.L., Tam, D., Bova, M., Lang, M., Drewes, G., et al. (2011). Chemoproteomics-based design of potent LRRK2-selective lead

compounds that attenuate Parkinson's disease-related toxicity in human neurons. *ACS Chem. Biol.* *6*, 1021–1028.

Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Pérez-Villalba, A., Fernagut, P.-O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., et al. (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* *75*, 351–362.

Reeve, A.K., Ludtmann, M.H.R., Angelova, P.R., Simcox, E.M., Horrocks, M.H., Klenerman, D., Gandhi, S., Turnbull, D.M., and Abramov, A.Y. (2015). Aggregated α -synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death Dis.* *6*, e1820.

Reith, A.D., Bamborough, P., Jandu, K., Andreotti, D., Mensah, L., Dossang, P., Choi, H.G., Deng, X., Zhang, J., Alessi, D.R., et al. (2012). GSK2578215A; a potent and highly selective 2-arylmethoxy-5-substituent-N-arylbenzamide LRRK2 kinase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 5625–5629.

Rey, N.L., Petit, G.H., Bousset, L., Melki, R., and Brundin, P. (2013). Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *126*, 555–573.

Richfield, E.K., Thiruchelvam, M.J., Cory-Slechta, D.A., Wuertzer, C., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Di Monte, D.A., and Federoff, H.J. (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp. Neurol.* *175*, 35–48.

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

Ross, O.A., Spanaki, C., Griffith, A., Lin, C.-H., Kachergus, J., Haugarvoll, K., Latsoudis, H., Plaitakis, A., Ferreira, J.J., Sampaio, C., et al. (2009). Haplotype analysis of *Lrrk2* R1441H carriers with parkinsonism. *Parkinsonism Relat. Disord.* *15*, 466–467.

Rudenko, I.N., and Cookson, M.R. (2010). 14-3-3 proteins are promising LRRK2 interactors. *Biochem. J.* *430*, e5–e6.

Rudenko, I.N., Kaganovich, A., Hauser, D.N., Beylina, A., Chia, R., Ding, J., Maric, D., Jaffe, H., and Cookson, M.R. (2012). The G2385R Variant of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Associated with Parkinson's Disease is a Partial Loss of Function Mutation. *Biochem. J.* *446*, 99–111.

Russo, I., Berti, G., Plotegher, N., Bernardo, G., Filograna, R., Bubacco, L., and Greggio, E. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down-regulates NF- κ B p50 signaling in cultured microglia cells. *J. Neuroinflammation* *12*.

Saha, S., Liu-Yesucevitz, L., and Wolozin, B. (2014). Regulation of autophagy by LRRK2 in *Caenorhabditis elegans*. *Neurodegener. Dis.* *13*, 110–113.

Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N.N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., Arai, T., Nagura, H., Yamanouchi, H., Hasegawa, M., et al. (2003). Accumulation of Phosphorylated α -Synuclein in Aging Human Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *62*, 644–654.

Sakamoto, M., Uchihara, T., Hayashi, M., Nakamura, A., Kikuchi, E., Mizutani, T., Mizusawa, H., and Hirai, S. (2002). Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp. Neurol.* *177*, 88–94.

Sampathu, D.M., Giasson, B.I., Pawlyk, A.C., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2003). Ubiquitination of α -Synuclein Is Not Required for Formation of Pathological Inclusions in α -Synucleinopathies. *Am. J. Pathol.* *163*, 91–100.

Santos, D., and Cardoso, S.M. (2012). Mitochondrial dynamics and neuronal fate in Parkinson's disease. *Mitochondrion* *12*, 428–437.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1269.

Schneider, B., Zufferey, R., and Aebischer, P. (2008). Viral vectors, animal models and new therapies for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *14*, Supplement 2, S169–S171.

Schultz, W. (1998). Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *J. Neurophysiol.* *80*, 1–27.

Sen, S., Webber, P.J., and West, A.B. (2009). Dependence of Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Kinase Activity on Dimerization. *J. Biol. Chem.* *284*, 36346–36356.

Sharma, S., Bandopadhyay, R., Lashley, T., Renton, A.E.M., Kingsbury, A.E., Kumaran, R., Kallis, C., Vilariño-Güell, C., O'Sullivan, S.S., Lees, A.J., et al. (2011). LRRK2 expression in idiopathic and G2019S positive Parkinson's disease subjects: a morphological and quantitative study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *37*, 777–790.

Sheng, Z., Zhang, S., Bustos, D., Kleinheinz, T., Pichon, C.E.L., 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.

Shimozawa, A., Ono, M., Takahara, D., Tarutani, A., Imura, S., Masuda-Suzukake, M., Higuchi, M., Yanai, K., Hisanaga, S., and Hasegawa, M. (2017). Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol. Commun.* *5*.

Shin, N., Jeong, H., Kwon, J., Heo, H.Y., Kwon, J.J., Yun, H.J., Kim, C.-H., Han, B.S., Tong, Y., Shen, J., et al. (2008). LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Exp. Cell Res.* *314*, 2055–2065.

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.* *34*, 418–433.

Sloan, M., Alegre-Abarategui, J., Potgieter, D., Kaufmann, A.-K., Exley, R., Deltheil, T., Threlfall, S., Connor-Robson, N., Brimblecombe, K., Wallings, R., et al. (2016). LRRK2 BAC transgenic rats develop progressive, L-DOPA-responsive motor impairment, and deficits in dopamine circuit function. *Hum. Mol. Genet.* ddv628.

Slone, S.R., Lavalley, N., McFerrin, M., Wang, B., and Yacoubian, T.A. (2015). Increased 14-3-3 phosphorylation observed in Parkinson's disease reduces neuroprotective potential of 14-3-3 proteins. *Neurobiol. Dis.* *79*, 1–13.

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.

Song, S., Wang, Y., Bak, S.Y., Lang, P., Ullrey, D., Neve, R.L., O'Malley, K.L., and Geller, A.I. (1997). An HSV-1 vector containing the rat tyrosine hydroxylase promoter enhances both long-term and cell type-specific expression in the midbrain. *J. Neurochem.* *68*, 1792–1803.

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

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6469–6473.

Stafa, K., Tsika, E., Moser, R., Musso, A., Glauser, L., Jones, A., Biskup, S., Xiong, Y., Bandopadhyay, R., Dawson, V.L., et al. (2014). Functional interaction of Parkinson's disease-associated LRRK2 with members of the dynamin GTPase superfamily. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 2055–2077.

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

Su, Y.C., and Qi, X. (2013). Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4545–4561.

Su, X., Kells, A.P., Huang, E.J., Lee, H.S., Hadaczek, P., Beyer, J., Bringas, J., Pivrotto, P., Penticuff, J., Eberling, J., et al. (2009). Safety Evaluation of AAV2-GDNF Gene Transfer into the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway in Aged and Parkinsonian Rhesus Monkeys. *Hum. Gene Ther.* *20*, 1627–1640.

Sulzer, D., and Zecca, L. (1999). Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: A review. *Neurotox. Res.* *1*, 181–195.

- Swant, J., Goodwin, J.S., North, A., Ali, A.A., Gamble-George, J., Chirwa, S., and Khoshbouei, H. (2011). α -Synuclein stimulates a dopamine transporter-dependent chloride current and modulates the activity of the transporter. *J. Biol. Chem.* *286*, 43933–43943.
- Tabbaa, S., Goulah, C., Tran, R.K., Lis, A., Korody, R., Stachowski, B., Horowitz, J.M., Torres, G., Stachowiak, E.K., Bloom, D.C., et al. (2000). Gene transfer into the central nervous system using Herpes Simplex Virus-1 vectors. *Folia Morphol.* *59*, 221–232.
- Tanji, K., Mori, F., Kito, K., Kakita, A., Mimura, J., Itoh, K., Takahashi, H., Kamitani, T., and Wakabayashi, K. (2011). Synphilin-1-Binding Protein NUB1 is Colocalized With Nonfibrillar, Proteinase K-Resistant α -Synuclein in Presynapses in Lewy Body Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *70*, 879–889.
- Tansey, M.G., and Goldberg, M.S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* *37*, 510–518.
- Taymans, J.-M., and Greggio, E. (2016). LRRK2 Kinase Inhibition as a Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease, Where Do We Stand? *Curr. Neuropharmacol.* *14*, 214–225.
- Taymans, J.-M., Vancaenenbroeck, R., Ollikainen, P., Beilina, A., Lobbestael, 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*.
- Tenenbaum, L., Chtarto, A., Lehtonen, E., Velu, T., Brotchi, J., and Levivier, M. (2004). Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J. Gene Med.* *6 Suppl 1*, S212-222.
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., and Coates, J.C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* *20*, 470–481.
- Thévenet, J., Pescini Gobert, R., Hooft van Huijsduijnen, R., Wiessner, C., and Sagot, Y.J. (2011). Regulation of LRRK2 Expression Points to a Functional Role in Human Monocyte Maturation. *PLoS ONE* *6*.
- Thiruchelvam, M., Richfield, E.K., Baggs, R.B., Tank, A.W., and Cory-Slechta, D.A. (2000). The Nigrostriatal Dopaminergic System as a Preferential Target of Repeated Exposures to Combined Paraquat and Maneb: Implications for Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *20*, 9207–9214.
- Tieu, K. (2011). A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *1*, a009316.
- Tong, Y., and Shen, J. (2012). Genetic analysis of Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1042–1046.
- Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime, E., Boyle, S., Kopan, R., Kelleher, R.J., and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 9879–9884.

Trinh, J., Amouri, R., Duda, J.E., Morley, J.F., Read, M., Donald, A., Vilariño-Güell, C., Thompson, C., Szu Tu, C., Gustavsson, E.K., et al. (2014). Comparative study of Parkinson's disease and leucine-rich repeat kinase 2 p.G2019S parkinsonism. *Neurobiol. Aging* 35, 1125–1131.

Troxler, T., Greenidge, P., Zimmermann, K., Desrayaud, S., Drückes, P., Schweizer, T., Stauffer, D., Rovelli, G., and Shimshek, D.R. (2013). Discovery of novel indolinone-based, potent, selective and brain penetrant inhibitors of LRRK2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 4085–4090.

Tsika, E., Kannan, M., Foo, C.S.-Y., Dikeman, D., Glauser, L., Gellhaar, S., Galter, D., Knott, G.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., et al. (2014). Conditional expression of Parkinson's disease-related R1441C LRRK2 in midbrain dopaminergic neurons of mice causes nuclear abnormalities without neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 71, 345–358.

Ujiie, S., Hatano, T., Kubo, S., Imai, S., Sato, S., Uchihara, T., Yagishita, S., Hasegawa, K., Kowa, H., Sakai, F., et al. (2012). LRRK2 I2020T mutation is associated with tau pathology. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 819–823.

Ulusoy, A., Febbraro, F., Jensen, P.H., Kirik, D., and Romero-Ramos, M. (2010). Co-expression of C-terminal truncated alpha-synuclein enhances full-length alpha-synuclein-induced pathology. *Eur. J. Neurosci.* 32, 409–422.

Unger, E.L., Eve, D.J., Perez, X.A., Reichenbach, D.K., Xu, Y., Lee, M.K., and Andrews, A.M. (2006). Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol. Dis.* 21, 431–443.

Uversky, V.N., Yamin, G., Munishkina, L.A., Karymov, M.A., Millett, I.S., Doniach, S., Lyubchenko, Y.L., and Fink, A.L. (2005). Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134, 84–102.

Van der Perren, A., Toelen, J., Carlon, M., Van den Haute, C., Coun, F., Heeman, B., Reumers, V., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., Debyser, Z., et al. (2011). Efficient and stable transduction of dopaminergic neurons in rat substantia nigra by rAAV 2/1, 2/2, 2/5, 2/6.2, 2/7, 2/8 and 2/9. *Gene Ther.* 18, 517–527.

Van der Perren, A., Van den Haute, C., and Baekelandt, V. (2015a). Viral vector-based models of Parkinson's disease. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 22, 271–301.

Van der Perren, A., Toelen, J., Casteels, C., Macchi, F., Van Rompuy, A.-S., Sarre, S., Casadei, N., Nuber, S., Himmelreich, U., Osorio Garcia, M.I., et al. (2015b). Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiol. Aging* 36, 1543–1558.

Vancaenenbroeck, R., Lobbstaël, E., Weeks, S.D., Strelkov, S.V., Baekelandt, V., Taymans, J.-M., and De Maeyer, M. (2012). Expression, purification and preliminary biochemical and structural characterization of the leucine rich repeat namesake domain of leucine rich repeat kinase 2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1824, 450–460.

Vandier, D., Rixe, O., Besnard, F., Kim, M., Rikiyama, T., Goldsmith, M., Brenner, M., Gouyette, A., and Cowan, K.H. (2000). Inhibition of glioma cells in vitro and in vivo using a recombinant adenoviral vector containing an astrocyte-specific promoter. *Cancer Gene Ther.* *7*, 1120–1126.

Vermilyea, S.C., and Emborg, M.E. (2015). α -Synuclein and nonhuman primate models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Methods* *255*, 38–51.

Vitte, J., Traver, S., Paula, A.M.D., Lesage, S., Rovelli, G., Corti, O., Duyckaerts, C., and Brice, A. (2010). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Is Associated With the Endoplasmic Reticulum in Dopaminergic Neurons and Accumulates in the Core of Lewy Bodies in Parkinson Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *69*, 959–972.

Volpicelli-Daley, L.A., Kirik, D., Stoyka, L.E., Standaert, D.G., and Harms, A.S. (2016a). How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *J. Neurochem.* *139*, 131–155.

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

Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., and Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *27*, 494–506.

Walker, M.D., Volta, M., Cataldi, S., Dinelle, K., Beccano-Kelly, D., Munsie, L., Kornelsen, R., Mah, C., Chou, P., Co, K., et al. (2014). Behavioral deficits and striatal DA signaling in LRRK2 p.G2019S transgenic rats: a multimodal investigation including PET neuroimaging. *J. Park. Dis.* *4*, 483–498.

Wallings, R., Manzoni, C., and Bandopadhyay, R. (2015). Cellular processes associated with LRRK2 function and dysfunction. *FEBS J.* *282*, 2806–2826.

Wandu, W.S., Tan, C., Ogbeifun, O., Vistica, B.P., Shi, G., Hinshaw, S.J.H., Xie, C., Chen, X., Klinman, D.M., Cai, H., et al. (2015). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (Lrrk2) Deficiency Diminishes the Development of Experimental Autoimmune Uveitis (EAU) and the Adaptive Immune Response. *PloS One* *10*, e0128906.

Wang, X., Kong, L., Zhang, G.-R., Sun, M., and Geller, A.I. (2004). A preproenkephalin-neurofilament chimeric promoter in a helper virus-free herpes simplex virus vector enhances long-term expression in the rat striatum. *Neurobiol. Dis.* *16*, 596–603.

Wang, X., Yan, M.H., Fujioka, H., Liu, J., Wilson-Delfosse, A., Chen, S.G., Perry, G., Casadesus, G., and Zhu, X. (2012a). LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 1931–1944.

Wang, Y., Shi, M., Chung, K.A., Zabetian, C.P., Leverenz, J.B., Berg, D., Srujijes, K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Siderowf, A.D., et al. (2012b). Phosphorylated α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Sci. Transl. Med.* *4*, 121ra20-121ra20.

- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 25009–25013.
- 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.
- Wersinger, C., Rusnak, M., and Sidhu, A. (2006). Modulation of the trafficking of the human serotonin transporter by human alpha-synuclein. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 55–64.
- West, A.B. (2015). Ten Years and Counting: Moving Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Inhibitors to the Clinic. *Mov. Disord.* *30*, 180–189.
- 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.
- Winner, B., Melrose, H.L., Zhao, C., Hinkle, K.M., Yue, M., Kent, C., Braithwaite, A.T., Ogholikhan, S., Aigner, R., Winkler, J., et al. (2011a). Adult neurogenesis and neurite outgrowth are impaired in LRRK2 G2019S mice. *Neurobiol. Dis.* *41*, 706–716.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011b). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 4194–4199.
- Xie, W., and Chung, K.K.K. (2012). Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *122*, 404–414.
- 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 α -Synuclein Pathology. *eNeuro* *4*.
- Xu, J., Kao, S.-Y., Lee, F.J.S., Song, W., Jin, L.-W., and Yankner, B.A. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat. Med.* *8*, 600–606.

- Xu, Q., Shenoy, S., and Li, C. (2012). Mouse models for LRRK2 Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *18, Supplement 1*, S186–S189.
- Yahalom, G., Orlev, Y., Cohen, O.S., Kozlova, E., Friedman, E., Inzelberg, R., and Hassin-Baer, S. (2014). Motor progression of Parkinson's disease with the leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutation: Disease progression in PD with G2019S mutation. *Mov. Disord.* *29*, 1057–1060.
- Yan, Z., Song, W.J., and Surmeier, J. (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J. Neurophysiol.* *77*, 1003–1015.
- Yin, G., Lopes da Fonseca, T., Eisbach, S.E., Anduaga, A.M., Breda, C., Orcellet, M.L., Szegő, É.M., Guerreiro, P., Lázaro, D.F., Braus, G.H., et al. (2014). α -Synuclein interacts with the switch region of Rab8a in a Ser129 phosphorylation-dependent manner. *Neurobiol. Dis.* *70*, 149–161.
- Youdim, M.B.H., and Bakhle, Y.S. (2006). Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br. J. Pharmacol.* *147*, S287–S296.
- Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Xu, S., Liu, C., Gao, Y., Yang, H., et al. (2007). Extensive nuclear localization of α -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* *145*, 539–555.
- 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.
- Zach, S., Felk, S., and Gillardon, F. (2010). Signal Transduction Protein Array Analysis Links LRRK2 to Ste20 Kinases and PKC Zeta That Modulate Neuronal Plasticity. *PLOS ONE* *5*, e13191.
- Zahid, M., Saeed, M., Yang, L., Beseler, C., Rogan, E., and Cavalieri, E.L. (2011). Formation of dopamine quinone-DNA adducts and their potential role in the etiology of Parkinson's disease. *IUBMB Life* *63*, 1087–1093.
- Zaltieri, M., Grigoletto, J., Longhena, F., Navarria, L., Favero, G., Castrezzati, S., Colivicchi, M.A., Della Corte, L., Rezzani, R., Pizzi, M., et al. (2015). α -synuclein and synapsin III cooperatively regulate synaptic function in dopamine neurons. *J. Cell Sci.* *128*, 2231–2243.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* *55*, 164–173.
- Zatloukal, K., Stumtner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., Kleinert, R., Prinz, M., Aguzzi, A., and Denk, H. (2002). p62 Is a Common Component of Cytoplasmic Inclusions in Protein Aggregation Diseases. *Am. J. Pathol.* *160*, 255–263.

- Zecca, L., Pietra, R., Goj, C., Mecacci, C., Radice, D., and Sabbioni, E. (1994). Iron and other metals in neuromelanin, substantia nigra, and putamen of human brain. *J. Neurochem.* *62*, 1097–1101.
- Zecca, L., Zucca, F.A., Albertini, A., Rizzio, E., and Fariello, R.G. (2006). A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* *67*, S8–S11.
- Zhang, G.R., Wang, X., Yang, T., Sun, M., Zhang, W., Wang, Y., and Geller, A.I. (2000). A tyrosine hydroxylase-neurofilament chimeric promoter enhances long-term expression in rat forebrain neurons from helper virus-free HSV-1 vectors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *84*, 17–31.
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Uéda, K., Yu, S., and Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of α -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.
- Zhang, Z., Burgunder, J.-M., An, X., Wu, Y., Chen, W., Zhang, J., Wang, Y., Xu, Y., Gou, Y., Yuan, G., et al. (2009). LRRK2 R1628P variant is a risk factor of Parkinson's disease among Han-Chinese from mainland China. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *24*, 1902–1905.
- Zheng, X., Yang, M., Tan, J., Pan, Q., Long, Z., Dai, H., Xia, K., Xia, J., and Zhang, Z. (2008). Screening of LRRK2 interactants by yeast 2-hybrid analysis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* *33*, 883–891.
- Zhou, H., Huang, C., Yang, M., Landel, C.P., Xia, P.Y., Liu, Y.-J., and Xia, X.G. (2009). Developing tTA Transgenic Rats for Inducible and Reversible Gene Expression. *Int. J. Biol. Sci.* *5*, 171–181.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., et al. (2004). Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* *44*, 601–607.

Titre : Etude de l'impact de la sur-expression de la partie C-terminale de LRRK2 mutée G2019S dans les neurones dopaminergiques de la substance noire.

Mots clés : Maladie de Parkinson, LRRK2, α -synucléine, vecteurs viraux

Résumé : Les protéines alpha-synucléine (α -syn) et leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) sont deux protéines ayant un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (MP) et interviennent aussi bien dans les formes dites sporadiques que dans les formes familiales. La mutation G2019S du gène codant pour LRRK2 est la mutation la plus fréquente. Cette mutation induit une augmentation de l'activité kinase de LRRK2 qui conduit à sa toxicité. Plusieurs hypothèses convergent vers l'idée que LRRK2 et l' α -syn interagiraient pour conduire à la dysfonction et/ou la mort des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire (SNc) dans la MP. Dans la première partie de cette étude, différentes formes sauvage (WT) ou mutée (G2019S) de LRRK2 ont été surexprimées spécifiquement dans les neurones de la SNc via l'utilisation de vecteurs lentiviraux (LV) et adéno-viraux associés (AAV). La question principale de cette étude était d'évaluer si l'expression spécifiquement neuronale de LRRK2 induisait la dégénérescence des neurones DA de la SNc. Nous avons généré des constructions comportant uniquement la partie C-terminale de LRRK2 (Δ LRRK2) en aval du domaine LRR. In vitro, le fragment Δ LRRK2G2019S présente une activité kinase supérieure au fragment Δ LRRK2WT avec une augmentation d'activité comparable à la forme entière de

LRRK2. In vivo, six mois après l'injection (PI) de Δ LRRK2 WT ou G2019S dans la SNc, les mesures du nombre de neurones montrent que seul le fragment Δ LRRK2G2019S induit une mort neuronale significative (30%) comparé à la forme Δ LRRK2WT, uniquement lorsque l'expression est générée via des vecteurs AAV. Ces résultats suggèrent que l'expression purement neuronale d'un fragment contenant le domaine kinase de LRRK2 est suffisante pour induire une dégénérescence de la SN. Dans la seconde partie du projet, nous avons étudié l'hypothèse que Δ LRRK2G2019S via son activité kinase amplifiée, pourrait augmenter la toxicité de l' α -syn mutée A53T. Pour répondre à cette question, les vecteurs AAV codant pour Δ LRRK2 G2019S ou une forme inactive de la kinase (Δ LRRK2G2019S/D1994A), et celui codant pour l' α -syn A53T ont été co-injectés dans la SNc. Les analyses réalisées à 6 et 15 semaines PI montrent que Δ LRRK2G2019S augmente la mort neuronale induite par l' α -syn A53T d'une manière kinase dépendante. Tous ces résultats supportent l'hypothèse que l'existence d'une interaction fonctionnelle entre LRRK2 et l' α -syn pourrait jouer un rôle fondamental dans la physiopathologie de la MP offrant des possibilités de stratégie de neuroprotection ciblant l'interaction LRRK2/ α -syn.

Title: Effect of the overexpression of the C-terminal fragment of LRRK2 harboring the G2019S substitution in dopaminergic neurons.

Keywords : Parkinson's disease, LRRK2, α -synuclein, viral vectors

Abstract : Alpha-synuclein (α -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 a marked increase of its kinase activity. A possible interplay between LRRK2 and α -syn may be involved in the dysfunction and/or in the death of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra (SNc) in PD. In the first part of the study, we evaluated whether the overexpression of LRRK2G2019S using lentiviral vectors (LVs) and adeno-associated virus (AAV2/9), which can overexpress transgenes selectively in neurons could trigger neurodegeneration in the SNc, in other words, whether cell-autonomous mechanisms are sufficient to trigger the degeneration of DA neurons. We generated constructs corresponding to the C-terminal domain of LRRK2 (Δ LRRK2) containing the kinase domain. Results of assays performed in vitro indicated that Δ LRRK2 retains biochemical properties of full length LRRK2. Six months after the stereotaxic injection of LV- Δ LRRK2G2019S in the SNc, the number of DA neurons was unchanged, however, the infection of the SNc with

AAV- Δ LRRK2G2019S but not with AAV- Δ LRRK2WT induced a significant \sim 30% loss of DA neurons. These results suggested that neuronal overexpression of the mutant kinase domain of LRRK2 was sufficient to trigger neurodegeneration in the SNc in the adult brain. In the second part of the study, we aimed at studying whether Δ LRRK2G2019S could increase the neurotoxicity of a mutant form of α -syn (A53T mutation) in vivo in DA neurons. We used a co-infection approach with AAV vectors encoding the α -synA53T, and Δ LRRK2 G2019S alone or with the D1994A mutation (Δ LRRK2G2019S/D1994A) that inactivates the kinase activity of LRRK2. AAVs were stereotaxically co-injected into the rat SNc and histological evaluation was performed at 6 and 15 weeks (early and late time points) post-infection. Results showed that Δ LRRK2G2019S increased the toxicity of α -synA53T in a kinase-dependent manner. Altogether, the present study supports the hypothesis that a functional interaction between LRRK2 and α -syn may play a key role in PD pathogenesis. The new "double hit" model we developed in rats may be of interest to test novel neuroprotective strategies targeting LRRK2/ α -syn in vivo.

