



HAL
open science

LRRK2 entérique : un lien entre maladie de Parkinson et maladie de Crohn ?

Adrien De Guilhem de Lataillade

► **To cite this version:**

Adrien De Guilhem de Lataillade. LRRK2 entérique : un lien entre maladie de Parkinson et maladie de Crohn ?. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1042 . tel-03983224

HAL Id: tel-03983224

<https://theses.hal.science/tel-03983224v1>

Submitted on 10 Feb 2023

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.

Thèse de doctorat de biologie santé

NANTES UNIVERSITE

Ecole Doctorale n° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *Neurosciences* »

Par

Adrien de GUILHEM de LATAILLADE

LRRK2 entérique :

un lien entre maladie de Parkinson et maladie de Crohn ?

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 15/12/22

Unité de recherche : INSERM UMR 1235

Rapporteurs avant soutenance :

Jean-Marc TAYMANS, MCU, Université de Lille et INSERM UMR 1172, Lille
Thibaud LEBOUVIER, PU-PH, Université de Lille et INSERM UMR 1172, Lille

Composition du Jury :

Président : Olga CORTI, DR, CNRS UMR 7225, INSERM U 1127 et Sorbonne Université, Paris

Examineurs : Jean-Marc TAYMANS, MCU, Université de Lille et INSERM UMR 1172, Lille
Thibaud LEBOUVIER, PU-PH, Université de Lille et INSERM UMR 1172, Lille

Dir. de thèse : Pascal DERKINDEREN, PU-PH, Nantes Université, INSERM UMR 1235, Nantes

Invité(s) : Philippe CODRON, CCA, CHU d'Angers, CNRS UMR 6015, INSERM UMR 1083, Angers

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Pascal. J'ai vraiment passé trois superbes années, et je le dois en grande partie à ton encadrement. Malgré la hiérarchie qu'imposent nos statuts respectifs de thésard et de directeur de recherche, je me suis toujours senti très libre de proposer, discuter, expérimenter, ce sur quoi tu as toujours su mettre un cadre plein de bon sens. J'ai pu apprécier tes qualités de scientifique, mais aussi tes qualités humaines, qui resteront, à n'en pas douter, une source d'inspiration. J'espère n'avoir jamais abusé de la liberté dans laquelle tu m'as laissé travailler. Et bien sûr merci d'avoir trouvé de quoi financer cette thèse, prérequis pratique mais sans quoi rien n'aurait été possible.

Je remercie l'ensemble des collègues de l'unité Tens pour ces trois années passées dans une ambiance chaleureuse. J'ai une pensée particulière pour Alice qui m'a gentiment accueilli au laboratoire sur son temps personnel, au prix de laisser filer ses premières allocations chômage. Une pensée pour Thibault avec qui j'ai eu le plaisir de discuter un peu tous les jours de science et rugby. Une pensée pour Malvyne qui m'a fait une place au chaud pendant deux ans auprès de ses connaissances et de sa sympathie sans limite (les deux). Une pensée aussi pour mes éphémères copains/collègues, Nora et Simon ; mon royaume pour travailler à nouveau avec vous plus tard. Une pensée spéciale également pour la dream team du bureau des thésards de ma dernière année, ce fut un plaisir d'apprendre à vous connaître et j'espère qu'on continuera à bad bitcher ensemble à l'avenir.

Merci aux chercheurs extérieurs à Tens qui ont joué le jeu de la collaboration avec Pascal et moi-même et qui ont permis de faire avancer nos pistes de recherche. Merci aux membres de mon jury qui ont accepté de consacrer du temps à ma thèse.

J'ai une pensée particulière pour ceux qui m'ont accompagné par le passé dans mon cursus de chercheur : Patricia Lemarchand au début des années de médecine, Philippe Moullier qui m'a ouvert les portes des Etats-Unis, et surtout Mark Haskins qui m'a donné une leçon d'accueil et de bienveillance dont je compte bien continuer à m'inspirer.

Je n'oublie pas les sympathiques rencontres que ces trois années ont mises sur ma route. Je pense à l'équipe du Babster 2, à vos côtés tous les midis étaient aussi savoureux qu'un mercredi frites-bonbons à l'internat. Je pense aussi aux coéquipiers du XV de l'Erdre, je suis ravi d'avoir rechaussé crampons et casque à pointe avec les meilleurs melons du coin. Une pensée également pour les actuels et anciens de la Cloche qui m'ont gentiment accueilli dans leurs pulsions de lien social, j'ai découvert un monde grâce à vous.

Je pense enfin aux copains qui voudront assister à ma soutenance et la fêter, l'intérêt que vous me portez me touche et je suis bien chanceux de vous avoir dans la vie. Une pensée pour mes parents, frères et sœur avec qui on se retrouvera avec plaisir à Noël, ou peut-être autour de cette thèse si la fièvre familiale nous gagne. Merci Maman d'avoir relu ma thèse. Enfin, comme tous les jours depuis bientôt 10 ans, une pensée pour ma femme adorée qui, par amour, plonge parfois dans les mondes hostiles de la science et du rugby.

Sommaire

Introduction	7
I - Contexte	8
II – Maladie de Parkinson et LRRK2	8
1. Point de vue du clinicien.....	8
2. Physiopathologie de la maladie de Parkinson	9
3. Découverte de LRRK2	12
4. LRRK2 dans un contexte physiologique	12
5. LRRK2 en pathologie.....	18
III- Maladie de Parkinson et tube digestif	21
1. Symptomatologie digestive et système nerveux entérique	21
2. Synucléinopathie entérique	25
3. Maladie de Parkinson, inflammation digestive et liens avec les pathologies inflammatoires de l'intestin.....	27
IV- LRRK2 au-delà de la Maladie de Parkinson	33
1. Autres implications pathologiques.....	33
2. Physiologie de LRRK2 dans l'appareil digestif	36
3. Liens avec les pathologies inflammatoires de l'intestin.....	37
Article 1 : LRRK2 is reduced in Parkinson's disease gut	40
Article 2 : LRRK2 expression in normal and pathologic human gut and in rodent enteric neural cell lines	55
Addendum méthodologique	79
Discussion	84
1. LRRK2 dans les cellules immunitaires digestives de la <i>lamina propria</i> et MP.....	85
2. LRRK2 dans les CGE muqueuses et MP	87
3. LRRK2 entérique et maladie de Crohn	90
4. AMPc/PKA et Lrrk2	96
Bibliographie	98
Articles en collaboration (1^{ère} page uniquement)	109
1. Tau accumulates in Crohn's disease gut.....	110
2. Enteric synucleinopathy : from trendy concept to real entity.....	111
3. Comparison of commercially available antibodies for the detection of phosphorylated α -synuclein in primary culture of ENS.....	112

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Atteinte du système nerveux autonome périphérique dans la MP et hypothèse de Braak (p. 10)

Figure 2 : Structure 2D et 3D de LRRK2 (p. 14)

Figure 3 : Régulation simplifiée de Rab10 par LRRK2 (p. 16)

Figure 4 : Anatomie et exploration du SNE (p. 24)

Figure 5 : Illustration de la synucléinopathie entérique (p. 25)

Tableau 1 : Résultats des quatre études épidémiologiques sur le lien entre MP et MICI à partir des bases de données nationales (p. 29)

Figure 6 : Inflammation colique dans la MP (p. 30)

Figure 7 : Trois scénarii pouvant expliquer le lien entre MP et inflammation digestive (p. 32)

Figure 8 : Expression de LRRK2 dans la paroi digestive (p. 37)

Figure 9 : Cytokines pro-inflammatoires et LRRK2 dans les biopsies des sujets parkinsoniens de l'article 1 (p. 87)

Figure 10 : Hypothèses sur la baisse de LRRK2 entérique dans la MP (p. 89)

Figure 11 : CD11b et LRRK2 dans les biopsies des patients porteurs d'une MC de l'article 1 (p. 91)

Figure 12 : Cytokines pro-inflammatoires et *LRRK2* dans les biopsies des patients de l'article 1 et d'autres porteurs d'une MC (p. 92)

Figure 13 : Nrf2 et LRRK2 dans les biopsies de patients et dans la culture de SNE (p. 93)

Figure 14 : Lrrk2 dans la culture de SNE traitée par cytokines pro-inflammatoires (p. 94)

Figure 15 : Hypothèses sur l'augmentation de LRRK2 entérique dans la MC (p. 95)

Figure 16 : Hypothèses sur la régulation de la phosphorylation de S935 par la PKA dans nos cultures de CGE (p. 97)

Abréviations

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ANK : ankyrin repeat

ARM : armadillo repeat motif

CARD15 : caspase recruitment domain-containing protein 15

CGE : cellules gliales entériques

CHIP : carboxyl terminus of HSP70-interacting protein

CL : corps de Lewy

COR : C-terminal of ROC

COX-2 : cyclooxygenase-2

CK1 α : casein kinase 1 α

CREB : C-AMP Response Element-Binding protein

CRP : c-reactive protein

DSP : dithiobis(succinimidyl propionate)

DSS : dextran sodium sulfate

ERK5 : extracellular signal-regulated kinase 5

GDI : GDP dissociation inhibitor

GDP : Guanosine diphosphate

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GTP : Guanosine triphosphate

GWA : genome-wide association

HEK-293 : Human embryonic kidney 293 cells

HSP90 : heat shock protein

IL-1 β ou 6 : interleukine

INF γ : interféron- γ

KI : knock-in

KO : knock-out

LED : Lupus érythémateux disséminé

LPS : lipopolysaccharides

LRRK2 : Leucine-rich repeat kinase 2

MC : maladie de Crohn

miARN : micro-ARN

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MP : maladie de Parkinson

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

NDP52 : nuclear dot protein 52 kDa

NOD2 : nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2

Nrf2 : nuclear factor erythroid 2-related factor

PP1 ou 2A: protéine phosphatase

PKA : protéine kinase A

RCH : rectocolite hémorragique

ROC : ras-of-complex

S935 : sérine 935

SCF-Fbx118 : Skp1-Cullin1-F-box

Sox-10 : SRY-related HMG-box

Sp1 : specificity protein 1

SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique

T73 : thréonine 73

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TNF- α : tumor necrosis factor

WB : western blot

Introduction

I - Contexte

J'ai réalisé une thèse de sciences qui vient compléter mon cursus médical dans le champ de la neurologie. Je souhaitais faire de la recherche avant même de débiter mes études de médecine et j'ai, depuis le début, tout entrepris pour être le plus possible associé à des travaux de recherche fondamentale. C'est dans cette démarche que je me suis rapproché du professeur Pascal Derkinderen en quête d'un sujet de thèse de science.

II – Maladie de Parkinson et LRRK2

1. Point de vue du clinicien

Historiquement, la première description de la maladie de Parkinson (MP) en tant que pathologie à part entière est attribuée à James Parkinson dans son ouvrage « An Essay on the Shaking Palsy » publié en 1817. Il décrit à l'époque six cas présentant un début des symptômes entre 50 et 65 ans avec un tremblement des membres au repos, une perte de force musculaire globale, une posture voûtée et des troubles de la marche (1).

Ces observations initiales restent globalement d'actualité, les critères diagnostiques cliniques de la MP idiopathique étant basés sur l'identification d'une **pathologie du mouvement** dont les principales caractéristiques sont regroupées sous le terme de syndrome parkinsonien (bradykinésie, tremblement lent de repos et rigidité musculaire) et qui doit être volontiers asymétrique, d'installation/aggravation progressive, et améliorée par la prise de précurseur de la dopamine (2,3). Mais les symptômes associés à la MP vont bien au-delà des troubles moteurs puisqu'on peut constater chez ces patients, parfois même longtemps avant le diagnostic, une hyposmie, des troubles du sommeil, des troubles digestifs (voir chapitre III-1.a) ou encore d'autres troubles dysautonomiques tels qu'une hypotension orthostatique ou un syndrome d'hyperactivité vésicale. Des troubles cognitifs peuvent également être présent mais apparaissent préférentiellement avec l'évolution de la maladie (4).

Le tableau s'aggrave ensuite progressivement sur tous les plans et va être responsable d'un **handicap** en lien avec les troubles moteurs qui répondent de façon plus aléatoire aux traitements dopaminergiques (5) et des troubles non moteurs, notamment cognitifs, qui peuvent passer au premier plan (6).

La MP concerne très peu de patients avant 50 ans, puis la prévalence augmente de manière exponentielle pour atteindre plus de 4% des plus de 80 ans pour l'estimation européenne la plus haute. L'incidence augmente également progressivement avec l'âge de manière parallèle (7) ; ainsi, comme pour la plupart des maladies neurodégénératives, l'**âge** est un **important facteur de risque** de MP.

L'arsenal thérapeutique à proposer aux patients est large, mais est uniquement symptomatique et cible quasi-exclusivement la voie dopaminergique (8). Les patients sont donc rapidement dans une impasse lorsque les symptômes non sensibles aux traitements dopaminergiques passent au premier plan.

2. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

C'est dans la première moitié du 20^{ème} siècle que vont être décrites les premières bases neuropathologiques de la MP. L'attention est attirée sur un noyau mésencéphalique, la **substance noire**, par des observations clinico-pathologiques de la toute fin du 19^{ème} siècle : l'autopsie d'un patient tuberculeux ayant développé un tremblement parkinsonien révèle une lésion causale au niveau de la substance noire. Par la suite, à l'occasion de sa thèse en 1919, Constantin Tretiakoff examine le mésencéphale de 9 patients parkinsoniens en comparaison de sujets témoins et rapporte deux éléments essentiels : i) une dépigmentation de leur substance noire, correspondant à une **perte des neurones pigmentés** qui la composent, ii) la présence d'inclusions pathologiques dans le cytoplasme de certains neurones survivants qu'il nomme **corps de Lewy (CL)**, Lewy étant le neuropathologiste allemand qui fit la première description de ces inclusion en 1912 (9,10). Au début des années 1960, Hornykiewicz identifia un **déficit majeur en dopamine** au niveau du **striatum** des patients parkinsoniens (11) comme conséquence de cette perte neuronale nigrale, constituant ainsi le rationnel des traitements dopaminergiques (12).

En 1997, une première anomalie génétique expliquant des cas familiaux de MP est découverte dans une famille italienne et trois familles grecques au sein du gène codant pour une protéine essentiellement neuronale et synaptique, l' **α -synucléine** (13). Au décours immédiat, il est rapporté que les CL sont fortement immunoréactifs pour l' **α -synucléine** (14). Synthétisant ces différentes découvertes, le **diagnostic neuropathologique** de MP requiert dorénavant la mise en évidence d'une perte neuronale dans la substance noire associée à la présence de CL immunoréactifs pour l' **α -synucléine** dans les neurones survivants.

L'atteinte neuropathologique au cours de la MP ne se limite toutefois pas à la substance noire. Si la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire est bien corrélée avec les symptômes moteurs de la maladie (15), c'est probablement l'**atteinte extra-nigrale** qui est responsable des manifestations non-motrices qui pour la plupart sont peu sensibles aux traitements dopaminergiques (4). Ainsi, on retrouve cette neuropathie parkinsonnienne ailleurs dans le système nerveux central (SNC) (par exemple atteinte néo-corticale qui serait responsable des troubles cognitifs (16), ou encore atteinte bulbo-pontique et trouble du comportement en sommeil paradoxal (17)), mais aussi dans le système nerveux périphérique autonome sympathique (18,19), parasympathique (18) et entérique (voir chapitre III-2.a et figure 1a).

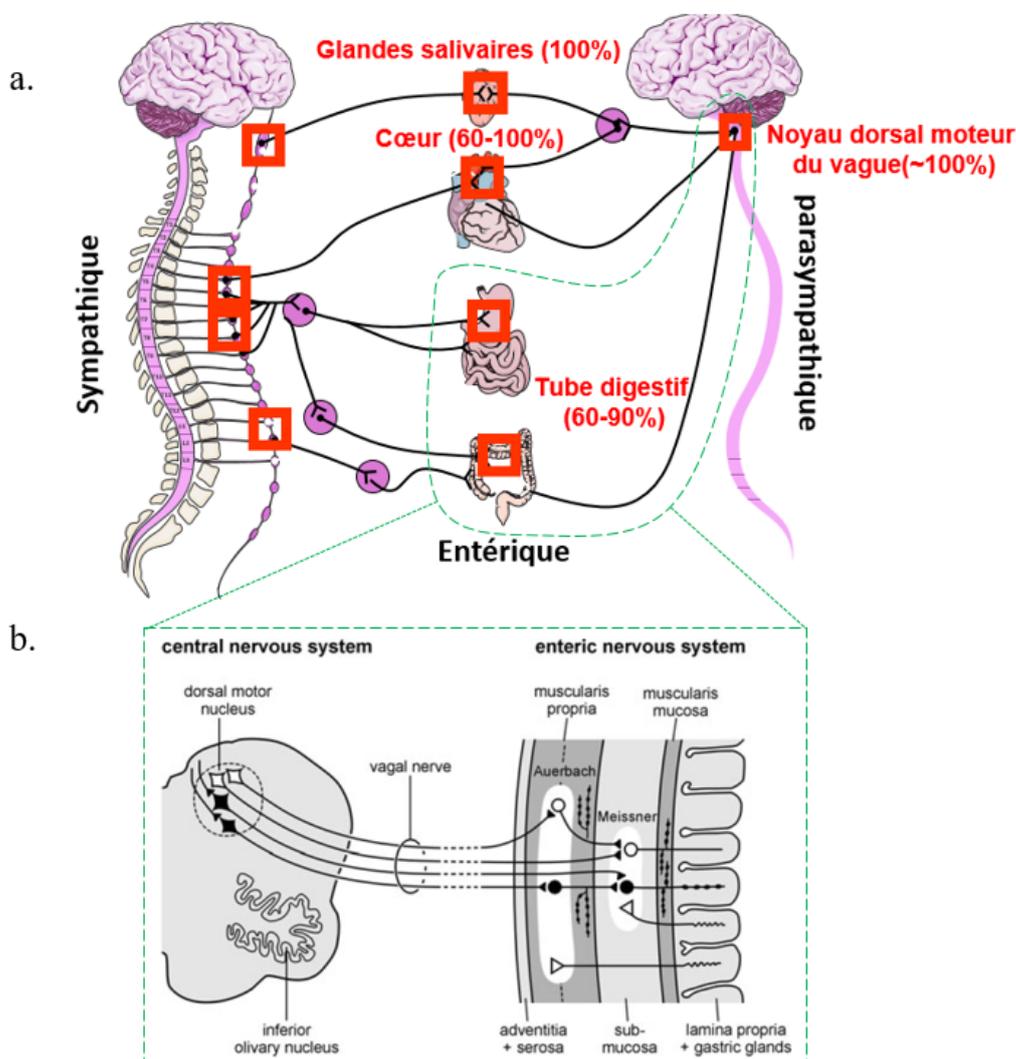


Figure 1 : Atteinte du système nerveux autonome périphérique dans la MP et hypothèse de Braak. a. Répartition des atteintes (rectangles rouges) du système nerveux autonome périphérique, ainsi que du noyau dorsal moteur du vague, le pourcentage de patients examinés effectivement atteints étant indiqué entre parenthèses. Traduit et adapté d'après Rouaud *et al.* (20). **b.** Hypothèse formulée par Heiko Braak en 2007 selon laquelle le processus pathologique débiterait dans le système nerveux autonome entérique avant de « contaminer » le SNC via le nerf vague. D'après Hawkes *et al.* (21). Auerbach : plexus myentérique ; Meissner : plexus sous-muqueux.

L'**histoire naturelle** de la maladie n'est aujourd'hui **pas parfaitement connue**. **Heiko Braak** et ses collaborateurs ont proposé dans les années 2000, à partir de leurs observations autopsiques, une évolution spatio-temporelle de proche en proche et stéréotypée des lésions d' α -synucléine pathologique chez tous les patients. Au niveau du SNC, la pathologie se développerait en six stades, les premières lésions apparaissant au niveau du noyau dorsal moteur du nerf vague, à la partie la plus basse du tronc cérébral, puis se développant de manière ascendante pour toucher, entre autres, la substance noire puis le cortex cérébral (22) ; l'équipe va même jusqu'à proposer que le **phénomène pathologique pourrait commencer** à l'extérieur du SNC, notamment **dans le système nerveux entérique** (SNE, voir chapitre III-1.b) où il serait déclenché par un pathogène de la lumière digestive, puis gagner le tronc cérébral via le nerf vague (21) (voir figure 1b). Cette hypothèse reste toutefois largement débattue et des travaux plus récents sont venus la nuancer (23) ; on peut notamment citer les travaux de l'équipe de Borghammer qui suggèrent que si effectivement la pathologie peut débuter en périphérie chez certains patients (« body-first »), d'autres peuvent avoir un point de départ central (« brain-first »)(24), les éléments en faveur étant cette fois-ci principalement issus d'imageries fonctionnelles du système nerveux (25).

Au niveau cellulaire, les **hypothèses physiopathologiques sont légion** pour expliquer la genèse de la neuropathie parkinsonienne. Ce sont les données épidémiologiques, neuropathologiques et surtout génétiques qui nourrissent ces différentes pistes de recherche. En effet, alors que l'hypothèse principale était celle d'une mitochondriopathie et du stress oxydatif avant les années 2000, la recherche s'est par la suite concentrée sur le rôle pathologique de l' α -synucléine, notamment sur ses propriétés de type « prion ». Finalement, les découvertes génétiques des dernières années ont largement élargi l'éventail des processus cellulaires possiblement impliqués en validant l'importance de l'homéostasie mitochondriale, mais aussi en pointant du doigt de nouveaux candidats tel que le système endo-lysosomal (20). Enfin, on peut citer un dernier élément physiopathologique d'intérêt qui est la mise en évidence d'une **neuro-inflammation** accompagnant la neuropathie parkinsonienne. En effet, les études *post-mortem* ont rapporté une activation microgliale associée à une infiltration lymphocytaire T des zones cérébrales pathologiques dans la MP, ainsi qu'une augmentation de médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β ou INF- γ (26). Des résultats similaires ont été obtenus du vivant des patients avec le TNF- α et l'IL-1 β qui s'avèrent élevés dans le liquide cérébro-spinal, ou encore l'imagerie nucléaire qui rapporte une augmentation diffuse du marquage de la microglie activée par le PK-11195 (26).

Pour mieux appréhender la physiopathologie de la MP, de nombreux **modèles animaux** ont été développés. Les espèces concernées sont mammifères (rongeurs et primates), ou non (*C. elegans*, drosophiles et poissons zèbres). La méthode utilisée correspond soit à l'exposition à une **neurotoxine**, soit à une **manipulation génétique**. Les neurotoxines sont administrées directement en intracérébral pour les molécules qui ne passent pas la barrière hémato-encéphalique (6-hydroxydopamine [6-OHDA]), ou par voie générale pour les autres (MPTP, paraquat et roténone), et correspondent à des toxiques mitochondriaux. Quant aux manipulations génétiques, elles reprennent les mutations découvertes chez l'homme par l'introduction d'un transgène ou un knock-in (KI) pour les mutations autosomiques dominantes (SNCA, *LRRK2*), et par un knock-out (KO) ou KI « perte de fonction » pour les autosomiques récessives (Parkin, PINK1 et DJ-1 par exemple) (27).

3. Découverte de LRRK2

LRRK2 (*Leucine-rich repeat kinase 2*) fait partie des gènes identifiés comme ayant un rôle dans la MP. C'est d'abord au Japon qu'une première famille est décrite en 2002 comme porteuse d'une anomalie génétique causale sur le **chromosome 12**, locus **PARK8** (28). En **2004**, deux équipes internationales, étudiant cette fois-ci des familles caucasiennes, identifient différentes mutations pathogènes dans un gène de ce locus qu'ils nomment PARK8 (29) ou *LRRK2* (30) (par homologie avec le gène LRRK décrit en 2002 (31)). Les deux équipes avancent alors une première description de la protéine dardarin (du basque « dardara » qui signifie tremblement), ou LRRK2, qui comporte un domaine kinase, un domaine GTPase et plusieurs domaines d'interaction.

4. LRRK2 dans un contexte physiologique

a) Localisation et structure

Avant que les premiers anticorps spécifiques ne soient disponibles, l'inventaire des tissus exprimant *LRRK2* a été fait par identification/quantification de l'ARNm (PCR et hybridation *in situ*). Ces premières études ont montré une **expression ubiquitaire**, très forte au sein des reins et poumons, plus modérée au niveau des différentes **structures cérébrales** avec un pic d'expression dans le striatum et le néocortex (29,30,32). L'avènement des immuno-marquages LRRK2 a confirmé ces données et permis de préciser la localisation cellulaire de la protéine. Dans le SNC, LRRK2 est aussi bien exprimée par les **neurones**, que par les **cellules gliales** ou que par la **microglie** (33) ; au niveau

subcellulaire neuronal, une étude de microscopie électronique sur du striatum de primate identifie LRRK2 principalement dans le cytoplasme dendritique et axonal, avec une expression péri-nucléaire plus faible (34). Enfin, par extrapolation des données chez les rongeurs, *Lrrk2* serait exprimée a minima durant la vie embryonnaire/fœtale, puis son expression cérébrale augmenterait rapidement après la naissance, durant la période de synaptogénèse (35).

Le gène *LRRK2* est composé de 51 exons avec une bonne conservation de sa séquence codante parmi les mammifères (80% d'homologie nucléotidique entre humains, rats et souris), et par conséquence une **séquence protéique également conservée** (88% d'homologie pour ces mêmes espèces). En revanche, les **séquences 5'** en amont affichent une **grande variabilité** inter-espèce qui pourrait expliquer des profils d'expression cérébrale distincts selon l'espèce du fait de modifications des séquences promotrices. C'est par exemple le cas pour les neurones dopaminergiques de la substance noire dans lesquels aucun signal *Lrrk2* n'est détecté chez le rat, contrairement à l'homme et la souris. L'expression de LRRK2 semble de même variable dans les interneurons cholinergiques du striatum, avec un marquage fort par les anti-LRRK2 chez l'homme et les primates qui contraste avec une quasi-absence de signal chez les rongeurs (36).

La protéine LRRK2 se compose de 2527 acides aminés répartis en sept domaines fonctionnels : **deux domaines catalytiques** (fonctions GTPase [ROC] et kinase [KIN]) et **cinq domaines d'interaction** (ARM, ANK, LRR, COR et WD40) (voir figure 2a). Ce n'est que très récemment qu'il a été possible de rapporter une première description de cryo-microscopie électronique de la protéine complète permettant d'identifier l'articulation 3D des différents domaines en état mono ou homodimérique avec un « domaine kinase inactif ». Dans cette configuration, LRRK2 est repliée sur elle-même, le domaine kinase interagissant avec le domaine LRR, la conformation globale étant stabilisée par deux hélices protéiques N (liant ARM, ANK et WD40 à partir de LRR) et C-terminales (liant KIN, ANK et COR à partir de WD40). L'homodimère décrit s'associe à travers le domaine COR et pourrait se lier aux protéines Rab, les phospho-substrats les plus décrits de LRRK2, via le domaine ARM (37) (voir figure 2b).

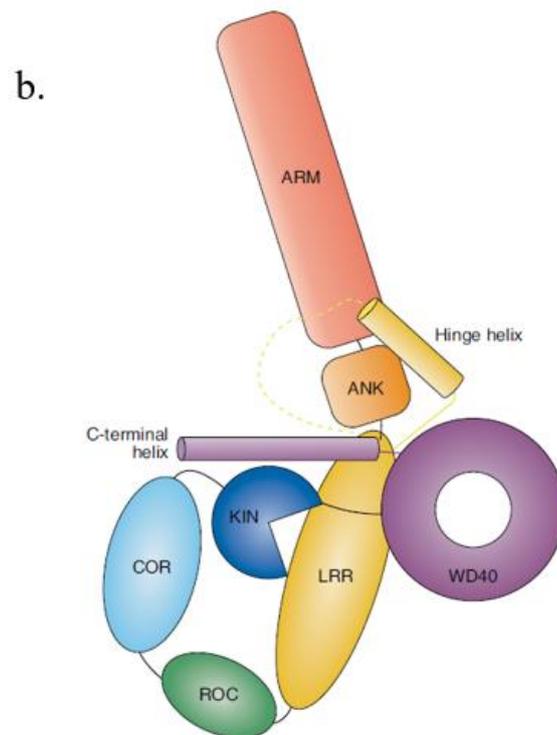
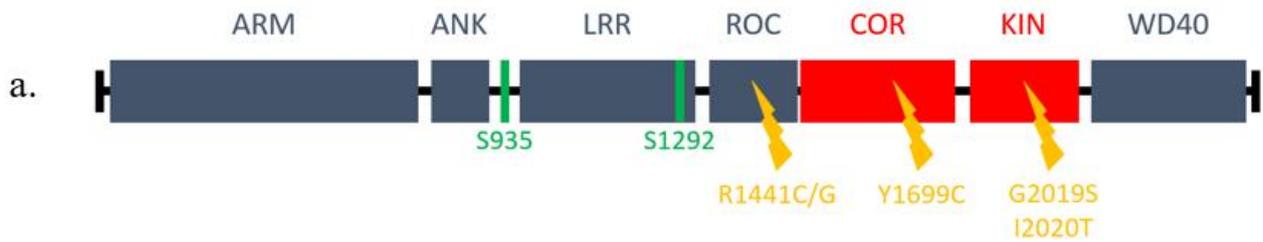


Figure 2 : Structure 2D et 3D de LRRK2. **a.** Représentation 2D de LRRK2 : les domaines catalytiques sont illustrés en rouge, les domaines d'interaction en bleu, deux des sites de phosphorylation les plus étudiés en vert (voir chapitre II-4.c) et les principales mutations pathogènes en jaune (voir chapitre II-5.a). **b.** Articulation 3D des domaines protéiques de LRRK2. D'après Myasnikov *et al.* (37).

b) Fonctions

Concernant ses fonctions physiologiques, LRRK2 a été **impliquée dans un très grand nombre de processus cellulaires**, au point qu'il est aujourd'hui difficile de dégager un rôle clair de la protéine. Une tendance à s'associer aux membranes et au cytosquelette a rapidement été identifiée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (34) ; de nombreuses études, portant principalement sur des modèles animaux ou cellulaires, porteurs de mutations pathologiques ou knock-out, suggèrent effectivement un rôle de LRRK2 dans la **régulation** d'un grand nombre d'**organites** (phagosomes et autres vésicules d'endocytose, lysosomes, vésicules du réseau trans-golgi, mitochondries, vésicules pré et post-synaptiques ou encore cils primaires non mobiles) (38), mais aussi dans la **dynamique du cytosquelette** (39). Concernant la **mitochondrie**, historiquement très liée à la MP (voir chapitre II-2), LRRK2 pourrait intervenir sur son contrôle de la balance d'oxydo-réduction, sa dynamique de fission/fusion ou encore son élimination via le processus de mitophagie (40). LRRK2 semble également impliquée dans l'**inflammation**, les arguments forts étant son expression importante dans les cellules de l'immunité innée et son lien génétique avec plusieurs maladies à forte composante inflammatoire (voir chapitre IV-1.a et d), les études *in vitro* ayant décrit des interventions de LRRK2 en amont et en aval des cascades moléculaires de l'inflammation (41). Enfin, de plus rares études ont proposé d'autres rôles pour LRRK2 : acteur clé de la signalisation intracellulaire, aux vues de la liste à rallonge de ses partenaires protéiques théoriques (42), ou encore régulateur de la traduction protéique (43).

Du point de vue de la mécanistique moléculaire, les **substrats de LRRK2** les plus étudiés sont les **protéines Rab**. Tout commence en 2016 avec la mise en évidence d'une régulation de la phosphorylation du résidu thréonine 73 (**T73**) de **Rab10**, en analyse phospho-protéomique dans des fibroblastes murins, suite à l'inhibition/activation spécifique de LRRK2 (44). Le génome humain comprend plus de 60 isoformes de protéines Rab, qui appartiennent à la famille des petites protéines G (porteuses d'une fonction GTPasique), et qui s'associent aux membranes via leur extrémité C-terminale, leur permettant d'y organiser le recrutement spatio-temporel de nombreux effecteurs. Leur capacité à s'associer aux membranes est hautement régulée par l'interaction avec les GDIs (GDP dissociation inhibitor), qui bloquent l'échange du GDP (état inactif) avec le GTP (état actif) et recouvrent le domaine hydrophobe C-terminal (45), cette interaction étant dépendante du domaine « switch II » ; c'est justement dans ce domaine, très conservé pour la majorité des isoformes de Rab chez l'homme ainsi que chez différentes espèces eucaryotes (notamment *C. elegans* et *D. melanogaster*), que se situe le résidu T73 de Rab10 phosphorylé par LRRK2. Steger *et al.* proposent alors qu'une part importante de la fonction cellulaire de LRRK2 passe par la phosphorylation du

domaine « switch II » d'une partie des Rab avec pour conséquence une inhibition de la liaison aux GDIs permettant de réguler dans le temps la présence des Rab à leurs membranes cibles (44) (voir figure 3). D'un point de vue pratique pour le chercheur, l'évaluation de la phosphorylation des Rab, particulièrement de Rab10 (46,47), est ainsi devenue la façon la plus répandue de mesurer l'activité kinase de LRRK2.

Mais la relation entre LRRK2 et les Rab est probablement plus complexe et bidirectionnelle, comme le montre l'exemple de Rab29 qui, au-delà d'être un phospho-substrat de LRRK2, a un impact sur la localisation subcellulaire et l'activité kinase de LRRK2 (48). Enfin, ces substrats sont d'autant plus intéressants dans le cadre de la MP que certains sont génétiquement liés à la pathologie en étant responsables de formes familiales, récessive pour Rab39b, dominante (avec mutation du domaine « switch II ») pour Rab32, ou en représentant un facteur de risque possible dans le cas de Rab29 (fait partie des cinq gènes du locus PARK16) ; ils sont également impliqués dans différents processus altérés dans la neuropathie parkinsonienne (homéostasie des lysosomes, réseau trans-golgi, *etc.*) (49).

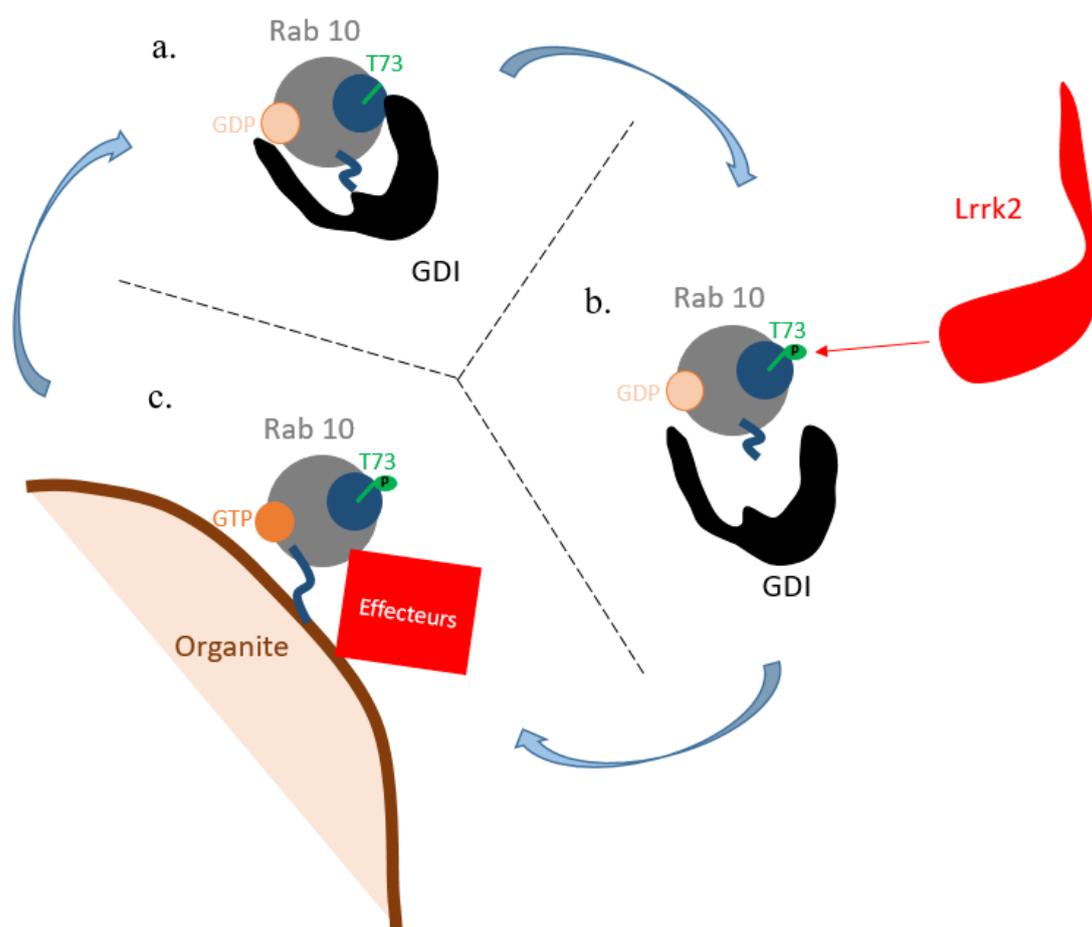


Figure 3 : Régulation simplifiée de Rab10 par LRRK2. Adapté de Steger *et al.* (44). **a.** Etat inactif (cytosolique et lié au GDP) de Rab10 stabilisé par une GDI. **b.** Phosphorylation du domaine switch II (T73) par LRRK2 responsable d'une diminution de l'affinité de Rab10 pour les GDIs. **c.** Etat activé (membranaire et lié au GTP) de Rab10 qui peut recruter des effecteurs (dont LRRK2 potentiellement) aux membranes.

c) Régulation

Concernant la régulation de LRRK2, beaucoup de travaux ont porté sur sa phosphorylation. En effet, la protéine possède **74 sites de phosphorylation théoriques**, essentiellement sur résidus sérines et thréonines, et s'avère phosphorylée en condition de base avec une régulation très dynamique des sites les plus étudiés. Parmi ceux-là, on trouve des sites d'hétéro-phosphorylation, avec un cluster N-terminal particulièrement étudié notamment au résidu sérine 935 (**S935**), ainsi que des sites d'auto-phosphorylation, le plus exploré étant la **S1292** (50) (voir figure 2a). Les kinases responsables de l'hétéro-phosphorylation sont à ce jour peu connues(50), on peut citer la protéine kinase A (**PKA**) qui fut la première décrite en 2007 : il est en effet montré que ses inhibiteurs spécifiques déphosphorylent LRRK2 dans un modèle de surexpression (HEK-293), et que PKA phosphoryle LRRK2 *in vitro* (51). Toujours dans des modèles de surexpression (HEK-293 et COS-7 transfectées), deux études viendront préciser que l'activation de la PKA est notamment responsable de phosphorylation du résidu S935 (52,53). Mais la relation LRRK2/PKA s'avère en réalité plus complexe, comme le montre une étude qui retrouve à l'inverse une diminution de la phosphorylation de S935 par l'activation de PKA en modifiant les condition expérimentale (déplétion en sérum du milieu des HEK-293 transgénique) ou en étudiant un autre type cellulaire (A549) sans surexpression, évoquant le fait que des phosphatases peuvent également intervenir dans cette interaction (54), voire que la régulation de LRRK2 par PKA peut dépendre du type cellulaire (50). D'autres kinases ont également été décrites comme modulant la phosphorylation de LRRK2, notamment en S935. Il s'agit de la casein kinase 1 α (CK1 α), pour laquelle la phosphorylation directe de LRRK2 a été documentée (55), ainsi que de la famille des kinases de I κ B (IKKs), dont l'effet a été montré dans plusieurs modèles cellulaires (macrophages issus de moelle osseuse de souris, lignées SH-SY5Y et HEK293)(50), mais sans que l'interaction directe avec LRRK2 soit établie (56). En ce qui concerne les phosphatases, la protéine phosphatase 1 (**PP1**) a été la première bien caractérisée, Taymans et ses collaborateurs rapportant sa régulation du cluster hétéro-phosphorylé N-terminal *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types cellulaires (dont HEK-293 et A549) (57). Une étude plus récente du même groupe confirme le rôle de la PP1 et identifie un rôle similaire de la **PP2A** en détaillant les sous-unités régulatrices indispensables à son effet sur LRRK2 (58). Ces modifications post-traductionnelles de LRRK2 semblent avoir un **impact fonctionnel majeur**, l'exemple le plus frappant étant que l'hétéro-phosphorylation de certains sites (notamment S935) augmente l'affinité de LRRK2 pour les protéines 14-3-3 ce qui a un fort impact sur sa distribution subcellulaire, et donc sur sa capacité à accéder à ses substrats (50).

Un autre aspect de la régulation de LRRK2 semble être sa capacité à former des **multimères**. La configuration la plus décrite est celle d'un homodimère qui, après avoir été identifié par plusieurs équipes *in vitro* et à partir des lysats cellulaires, a pu être confirmé en microscopie au sein de cellules vivantes surexprimant LRRK2. Les analyses biochimiques et de microscopie s'accordent pour localiser ces dimères de LRRK2 aux structures membranaires, tandis que la forme monomérique est plutôt cytoplasmique. Enfin, les arguments biochimiques plaident pour une activité kinase accrue de cette forme dimérique localisée aux membranes (59). Ainsi, la multimérisation de LRRK2 est une piste intéressante pour mieux comprendre sa régulation, toutefois la conformation exacte de la forme active reste aujourd'hui un sujet de recherche.

La **régulation de l'expression** de *LRRK2* a été étudiée de manière moins systématique que la phosphorylation de sa protéine. Au niveau transcriptionnel, l'interféron- γ (**INF γ**) induit une expression de *LRRK2* (60) via **ERK5** (61) (*extracellular signal-regulated kinase 5*) dans la lignée monocyttaire humaine THP-1. La région promotrice 5' de *LRRK2* contient également des sites de fixation pour le facteur de transcription **Sp1** (*specificity protein 1*) (62), ce dernier étant responsable d'une régulation positive (validée dans différents modèles humain, rat et souris) (62,63).

La traduction des ARNm de *LRRK2* semble également régulée par plusieurs micro-ARN (**miARN**) : pour les 205 (site de fixation conservé entre les vertébrés, bonne corrélation avec LRRK2 dans le cerveau humain) (64), 599(65) et 335 (66), l'effet sur LRRK2 a été validé sur des lignées humaines *in vitro*.

Enfin, plusieurs publications s'intéressent au catabolisme de LRRK2. Celui-ci serait assuré par le **protéasome**, les modulateurs identifiés étant : HSP90 (*heat shock protein*) (67), les ubiquitines ligases CHIP (*carboxyl terminus of HSP70-interacting protein*)(68,69) et celle du complexe SCF-Fbx118 (*Skp1-Cullin1-F-box*) (70), ainsi que la PP2A (58). Mais LRRK2 serait également éliminée par les lysosomes, principalement via l'**autophagie médiée par les chaperonnes** (71).

5. LRRK2 en pathologie

a) *Les mutations*

Le potentiel pathologique de LRRK2 dans la MP est prouvé par l'existence de **formes familiales** liées aux **mutations** de son gène. Parmi l'ensemble des mutations décrites, cinq **faux sens** sont actuellement reconnues comme indiscutablement pathogènes du fait de leur co-ségrégation avec le phénotype MP (**G2019S**, R1441C/G, I2020T et Y1699C) (voir figure 2a), le reste n'ayant pas été

décrit dans de suffisamment grande famille (R1441H, N1437H, *etc.*). G2019S est **la plus fréquente**, avec une importante disparité selon l'origine ethnique, puisqu'on la retrouve jusqu'à environ 40% des cas, qu'ils soient familiaux ou sporadiques, en Afrique du nord, alors qu'elle représente 3,5% des cas familiaux en France et quasiment aucun en Asie. De nombreux autres polymorphismes du gène *LRRK2* ont été identifiés, certains étant fortement suspectés d'être pathogènes car surreprésentés chez les patients MP en comparaison de contrôles de même origine ethnique, à l'image du variant G2385R considéré comme le facteur de risque génétique de MP le plus fréquent en Asie (72).

Un enjeu important de la recherche sur *LRRK2* est de comprendre en quoi ces mutations influencent la fonctionnalité de la protéine. Concernant G2019S, elle modifie un résidu situé dans un trio d'acides aminés fonctionnellement important pour l'activation/inhibition de nombreuses kinases (motif « DFG », ou plutôt « DYG » dans le cas particulier de *LRRK2* (73)). I2020T se situe directement à la suite de ce motif (73). Pour les mutations R1441C/G et Y1699C, l'étude récente en cryo-microscopie électronique permet de situer les résidus concernés à l'interface d'interaction des domaines ROC et COR (37) modifiant ainsi potentiellement l'agencement du domaine GTPasique ; en effet, *in vitro*, R1441C/G/H et Y1699C diminuent l'activité GTPasique de *LRRK2* (74,75). De manière intéressante, lorsqu'elles sont réintégrées au sein d'un système cellulaire, les cinq mutations indiscutablement pathogènes sont responsables d'une augmentation de l'activité kinase en direction des substrats physiologiques Rab (44) ; bien que les mécanismes moléculaires sous-tendant ce phénotype commun restent mal compris, une hypothèse plausible est celle d'une augmentation plutôt directe de l'activité kinase via les mutations du domaine kinase, et a contrario d'un mécanisme plutôt indirecte pour les mutations ROC/COR, en stabilisant l'homodimère de *LRRK2* par exemple (76).

b) Données des patients et modèles animaux

Le rôle pathologique de *LRRK2* dans la MP serait donc lié à un **gain de fonction kinase**. Sur l'aspect gain de fonction, les éléments sont convaincants : l'effet pathologique des mutations est de transmission autosomique dominante et les variants responsables d'une perte de fonction du gène *LRRK2* ne sont associés à aucune condition pathologique (77). Du côté des modèles animaux (murins, drosophile et *C.elegans*), les KO ne développent pas d'atteinte du SNC mais plutôt un phénotype rénal et pulmonaire anormal. A l'inverse, les modèles transgéniques surexprimant *LRRK2* muté développent une neurodégénérescence associée à des dépôts d' α -synucléine et de Tau ; de même, les modèles KI, bien que ne développant pas de neurodégénérescence, présentent des anomalies neurophysiologiques qui pourraient s'apparenter à une forme prodromale de MP (78) avec un mécanisme pathologique probablement plus proche de celui en cause chez les patients.

Concernant le rôle de l'activité kinase, en plus des données sus-citées issues de l'étude fonctionnelle des versions mutées de *LRRK2* (voir chapitre II-5.a), on peut citer les travaux de 2018 de Di Maio *et al.* qui rapportent une nette augmentation de la phosphorylation de Rab10 dans la substance noire des patients ayant une MP idiopathique (79), étendant le **rôle potentiel de LRRK2 dans la MP au-delà des formes génétiques**. Par ailleurs, les inhibiteurs d'activité kinase spécifiques de *Lrrk2* ont un effet neuroprotecteur dans différents modèles animaux de MP, qu'ils soient toxiques (rats traités par la roténone (79)) ou génétiques (surexpression d' α -synucléine dans la substance noire (80)). C'est dans le cadre de cette hypothèse de gain de fonction kinase toxique que se développent les premiers **essais cliniques d'inhibiteurs kinase** de LRRK2, à l'image du DNL201 dont les résultats de phase 1b ont été dévoilés (81).

c) Les limites

Les **zones d'ombres** restent toutefois nombreuses concernant les mécanismes pathogènes précis impliquant LRRK2 dans la MP. En effet, l'activité kinase de LRRK2 est mise en avant comme étant l'élément central, mais l'**activité GTPasique**, étudiée de manière moins systématique alors qu'également perturbée par les mutations, pourrait-elle être incriminée au même plan ? La capacité de LRRK2 à associer plusieurs partenaires protéiques (« **scaffolding protein** ») pourrait également être une autre piste sérieuse sur ses fonctions physiopathologiques clés, avec dans ce cas une grande importance de sa localisation subcellulaire ; il est alors intéressant de noter que des éléments en faveur d'une localisation anormale de LRRK2 ont été notés dans les études cérébrales *post-mortem* des sujets avec une MP idiopathique qui rapportent des CL LRRK2-positifs (33) et une déphosphorylation N-terminale, notamment en S935 (qui pour rappel régule l'affinité aux protéines 14-3-3 et donc la localisation subcellulaire de LRRK2 (82)). Quant à la/les fonctions physiologiques principalement altérées par ces dérégulations de LRRK2, la liste des possibles est aussi large que celle dressée des processus cellulaires dans lesquels LRRK2 pourrait intervenir (voir chapitre II-4.b). Enfin, l'**effet pathologique** lié à LRRK2 intervient-il directement dans les **neurones** ? Ou est-il médié par les cellules environnantes (**gliales, microgliales**) (83), voire par un **autre organe** hors du SNC comme le tube digestif (voir chapitre III-3.f) ?

III- Maladie de Parkinson et tube digestif

1. Symptomatologie digestive et système nerveux entérique

a) État des lieux des symptômes

Comme mentionné plus haut, la symptomatologie de la MP n'est pas uniquement motrice mais également dysautonomique, et particulièrement digestive. En effet, dans une étude de 2007, Verbaan *et al.* comparent la symptomatologie déclarée de plus de 400 patients parkinsoniens avec 150 sujets témoins et rapportent que les troubles gastro-intestinaux sont plus fréquents (5 fois plus pour la constipation, par exemple) et plus sévères (score moyen sur 100 environ 4 fois plus élevé) dans la MP, et qu'ils corrélaient avec la sévérité du handicap généré par la maladie (84). **Ces troubles digestifs concernent tous les étages du tractus oeso-gastro-intestinal** : sialorrhée (4 à 10 fois plus fréquent que dans le groupe témoin selon les études), dysphagie (prévalence de 82% aux tests objectifs), gastroparésie (prévalence estimée entre 70 et 100%) et constipation (prévalence hautement variable, 2 à 5 fois plus fréquent que dans le groupe contrôle pour la plupart des études) plus ou moins associée à de la dyschésie (85).

Ces atteintes fonctionnelles digestives ont nourri un effort de recherche visant la mise en évidence de lésions causales. La MP étant avant tout une neuropathie, un grand intérêt a été porté au **SNE**.

b) Le système nerveux entérique

Le tube digestif se distingue en effet des autres organes du fait qu'il possède son propre système nerveux dont les corps cellulaires sont intégrés dans sa paroi, de l'œsophage jusqu'au rectum (86). Ce SNE contient environ 168 millions de neurones chez l'homme, ce qui équivaut à la composition de la moelle épinière (87), et s'organise principalement en **ganglions** répartis en deux plexus : le **myentérique** (ou d'Auerbach), qui se trouve entre les couches de muscles longitudinaux et circulaires, et le **sous-muqueux** (ou de Meissner), plus proche de la lumière digestive (voir figure 4a). Il peut fonctionner de manière autonome, mais il est aussi hautement **connecté** avec le SNC via les **systèmes sympathique et parasympathique** (86).

Le SNE est composé de **neurones** sensitifs, d'inter-neurones et de neurones effecteurs (moteurs et sécréto-moteurs notamment), mais aussi de **cellules gliales entériques** (CGE) (88). Même si elles sont longtemps restées dans l'ombre après leur première identification à la fin du 19^{ème} siècle (89), ces CGE sont intéressantes à plus d'un titre. En effet, elles surpassent en nombre les

neurones entériques (90) et, contrairement à ces derniers (densité neuronale similaire entre souris, cochon d'inde et homme) (87), elles sont enrichies dans le SNE humain par rapport à d'autres mammifères (rapport glie/neurones à 1,5 vs 0,9 en sous-muqueux et 6,5 vs 1,7 en myentérique chez l'homme vs le cochon d'inde respectivement) (90). Bien que proches des astrocytes du SNC en plusieurs points (morphologie, expression de marqueurs communs dont S100 β et GFAP, propriétés neurophysiologiques et neuroprotectrices) (89), elles possèdent leur propre hétérogénéité même si aucune classification actuelle ne parvient à véritablement en distinguer fonctionnellement les sous-types (91) ; on peut tout de même pour l'exemple distinguer les CGE intra-ganglionnaires, qui englobent les neurones et modulent la neurotransmission, des CGE muqueuses qui viennent au contact des cellules épithéliales et influencent leur différenciation (89,91). Enfin, elles peuvent être impliquées dans les pathologies humaines (91), et notamment dans la **MP** ou une **possible réaction gliale** (92) a été documentée par analyse de biopsies coliques en western blot et RT-PCR, avec une augmentation du niveau d'expression des marqueurs gliaux GFAP et sox-10 chez des sujets parkinsoniens (93,94) par rapport à des témoins.

Le rôle fonctionnel propre au SNE est notamment établi par les pathologies qui le ciblent de manière spécifique : ainsi, au cours de la maladie de Hirschprung (affection génétique), le SNE ne se développe pas dans la partie distale du colon qui s'avère alors acontractile dès la naissance ; une constatation similaire peut être faite chez l'adulte à travers la maladie de Chagas (affection parasitaire), au cours de laquelle l'infection chronique de la paroi colique entraîne une mort progressive des neurones entériques, et qui est responsable d'une altération sévère du transit colique (86). Si ce n'est toutes, de nombreuses fonctions digestives sont contrôlées/modulées par le SNE, les mieux documentées étant la **motricité intestinale** (plexus myentérique principalement) et la **sécrétion d'eau et d'électrolytes** vers la lumière digestive (plexus sous-muqueux principalement). Mais le rôle du SNE dans ces différentes fonctions peut aller de simple modulateur à centre intégrateur et effecteur selon la fonction et le segment intestinal considérés ; pour exemple, la motricité gastro-œsophagienne nécessite une bonne intégrité des boucles réflexes vago-vagales tandis que la motricité du petit intestin et du colon est principalement orchestrée par le SNE en réaction au passage du bol alimentaire (86).

L'étude du SNE chez les patients peut se faire soit de leur vivant, à partir de **biopsies** ou de **prélèvements peropératoires**, soit en *post-mortem* à partir de prélèvements autopsiques. Dans le cadre de la MP, les patients subissent rarement des chirurgies digestives, les biopsies sont donc particulièrement intéressantes et peuvent être prélevées au cours d'une fibroscopie (prélèvements œsophagiens, gastriques ou duodénaux), d'une coloscopie (prélèvements coliques droits, transverses,

gauches, sigmoïdiens ou rectaux) ou d'une simple recto-sigmoïdoscopie (prélèvements sigmoïdiens ou rectaux, voir coliques gauches). L'avantage des prélèvements *post-mortem* ou peropératoires est qu'ils permettent d'étudier l'ensemble de la paroi digestive et donc le plexus myentérique. A l'inverse, les biopsies ne capturent que de la muqueuse ainsi qu'une part variable de sous-muqueuse ; elles permettent cependant d'analyser les ganglions sous-muqueux, la glie (89) et les prolongements neuronaux muqueux comme le rapporte l'étude de Lebouvier *et al.* dans laquelle il est estimé qu'une biopsie contient en moyenne 150 neurones entériques (95) (voir figure 4b). En plus de ces méthodes statiques, il est possible d'étudier dynamiquement le SNE, notamment à travers différents modèles de culture primaire. Ainsi, une **culture** représentative du **SNE** myentérique (composée de neurones, de CGE et de cellules musculaires) peut par exemple être établie à partir d'intestins d'embryons de rats (96). De manière à étudier plus spécifiquement une type cellulaire donné, il est aussi possible d'obtenir des cultures purifiées en CGE, toujours à partir d'embryons de rats (97) ou à partir de tubes digestifs adultes (98), ou purifiées en neurones entériques par ajout d'un antimétabolite (99,100).

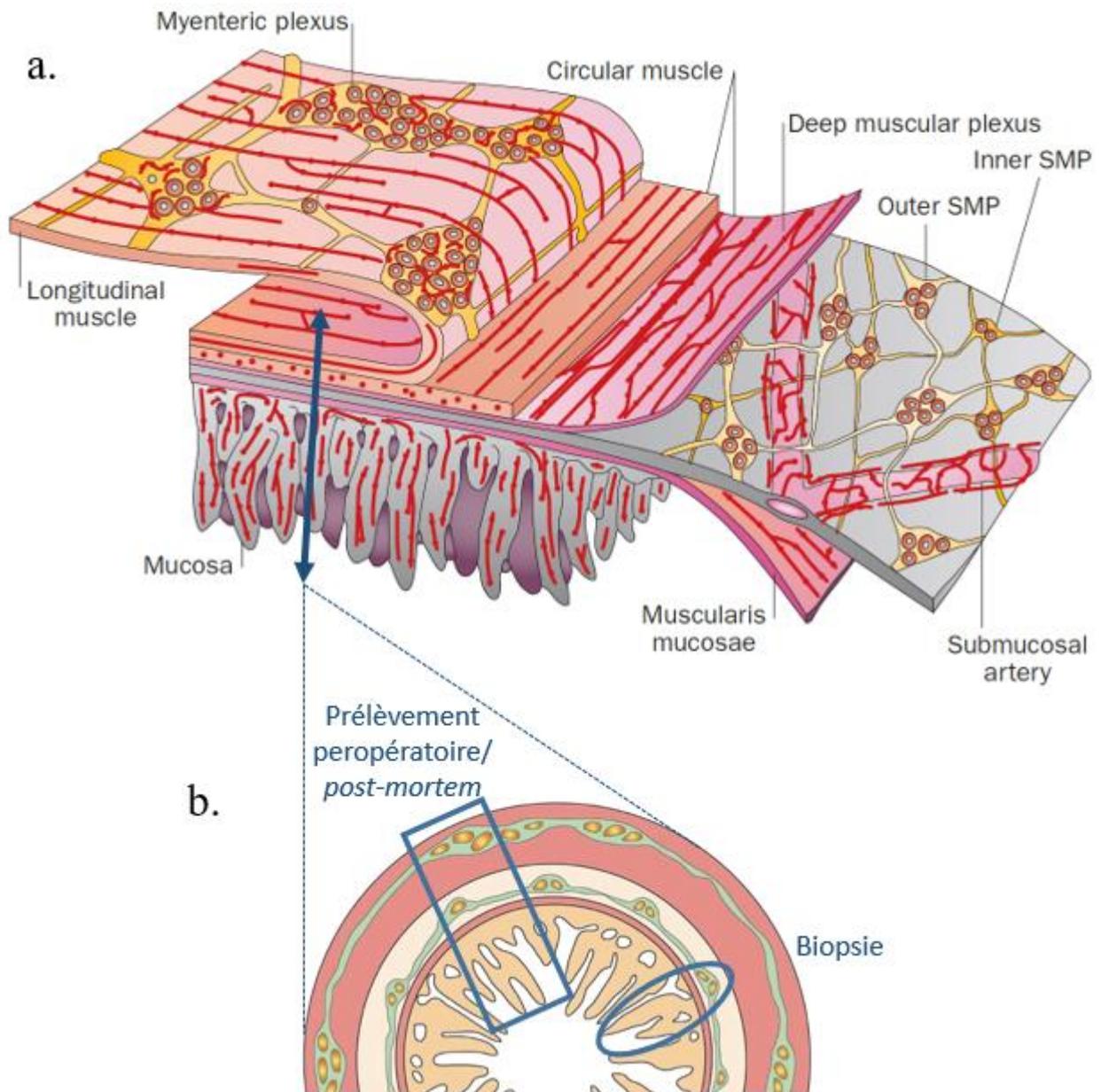


Figure 4 : Anatomie et exploration du SNE. **a.** Organisation du SNE en ganglions au sein du plexus myentérique, entre les couches musculaires longitudinale et circulaire, et du plexus sous-muqueux (SMP), proche de la muqueuse. Le SNE innerve toutes les structures de la paroi digestive (muscles, artères, muqueuse). D'après Furness (86). **b.** Les prélèvements *post-mortem* ou per-opératoires permettent d'étudier l'ensemble de l'épaisseur de la paroi digestive incluant les 2 plexus nerveux, tandis que les biopsies ne peuvent capturer que le plexus sous-muqueux.

2. Synucléinopathie entérique

a) Pathologie de Lewy et dépôts d' α -synucléine dans le SNE

La première mise en évidence de lésions de type CL dans le SNE remonte à 1984 dans l'œsophage de patients parkinsoniens souffrant de dysphagie (101). Depuis, plusieurs études ont entrepris l'analyse du SNE dans la MP avec des méthodes de détection plus sensibles basées sur l'immuno-marquage de l' α -synucléine : des **dépôts anormaux** sont mis en évidence chez **la plupart des patients**, sur toute la longueur du tube digestif, aussi bien dans le plexus myentérique que sous-muqueux, plusieurs études intégrant des groupes témoins qui valident la spécificité de ces lésions (102). Ils prennent soit la forme de CL dans le pericaryon soit la forme de prolongement de Lewy dans les prolongements neuronaux (figure 5). L' α -synucléine entérique pathologique a par exemple été rapportée dans deux études avec prélèvements *post-mortem*, intégrant au total 41 patients atteints de MP ou démence à CL (maladie apparentée), chez lesquels environ 70% des patients sont porteurs des lésions dans le SNE (18,103), les atteintes étant plus souvent identifiées dans le plexus myentérique (103).

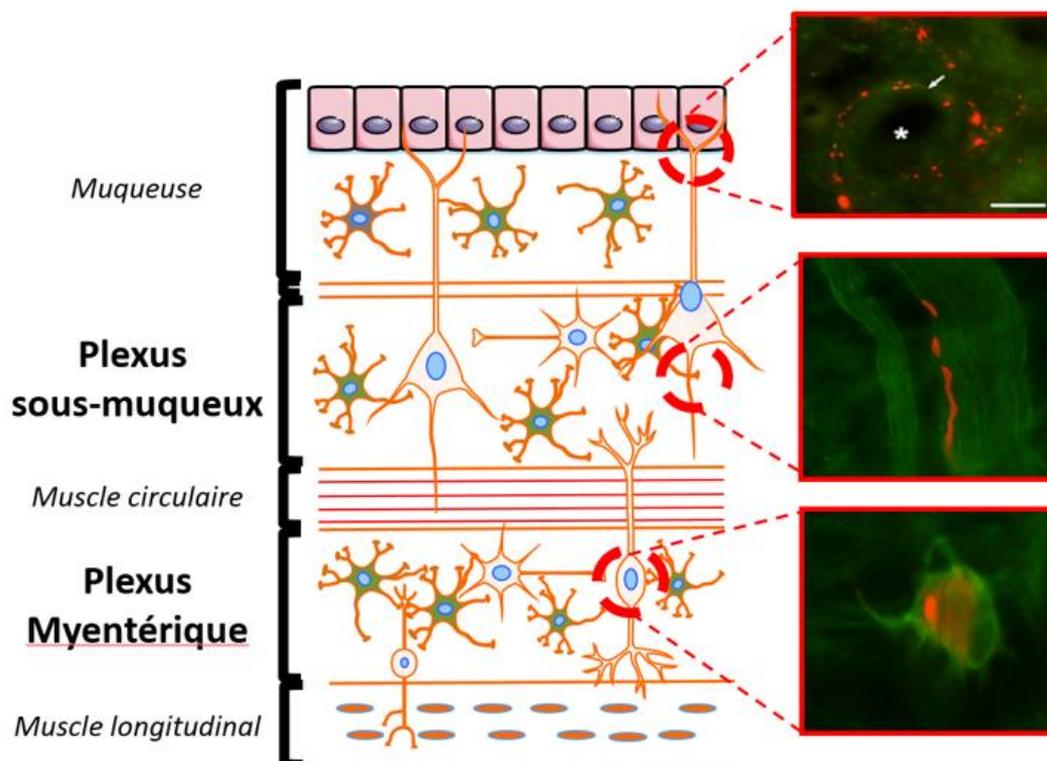


Figure 5 : Illustration de la synucléinopathie entérique. Traduit de de Guilhem de Lataillade *et al.* (102). Coupe transversale de colon humain d'un sujet parkinsonien. Immunohistochimie phospho- α -synucléine montrant la présence de structures évocatrices de CL dans un neurone myentérique et de prolongement de Lewy dans le plexus sous-muqueux et la muqueuse (indiquée par la flèche, l'astérisque désigne la crypte intestinale). Barre d'échelle = 40 μ m.

Concernant la caractérisation biochimique de ces dépôts d' α -synucléine vus en microscopie, les travaux dans le **SNC** rapportent notamment une **hyperphosphorylation**, une troncation et une **agrégation** en formes de haut poids moléculaire de l' α -synucléine (104) associées à des propriétés **type « prion »** avec une capacité à transformer des protéines natives en protéines pathologiques ; cette propriété existe *in vitro* (105), mais aussi *in vivo* puisque le fait d'injecter en intracérébral une faible quantité d' α -synucléine pathologique, provenant de cerveaux de patients, déclenche d'authentiques synucléinopathies chez le rongeur ou le primate (106). Du côté du **SNE**, une telle **caractérisation** n'en est qu'**à ses débuts** : l' α -synucléine pathologique est résistante aux protéases (K et alcalines), probablement du fait de son agrégation, elle pourrait être hyperphosphorylée et agrégée en formes de haut poids moléculaire, comme le suggèrent des résultats préliminaires contrôlés sur un unique patient de Derkinderen et Lebouvier (107), enfin elle capable de transmettre sa conformation pathologique *in vitro* (108).

Deux résultats doivent toutefois amener à rester prudent sur la comparaison des synucléinopathies centrale et entérique : l'inoculation intracérébrale d' α -synucléine pathologique issue du système nerveux autonome périphérique (ganglion stellaire) n'a pas montré de pathogénicité chez la souris (109), et l'appendice iléo-caecal des sujets sains contient de l' α -synucléine oligomérisée, tronquée et résistante à la protéinase K sans être pour autant associée à une condition pathologique (110).

b) Altération du tissu neural

En dehors des dépôts d' α -synucléine, l'atteinte centrale de la MP s'accompagne d'une perte neuronale associée une neuro-inflammation (vois chapitre II-2). Concernant la **perte neuronale**, celle-ci n'a **pas** été retrouvée **dans le SNE**, que ce soit au niveau du plexus myentérique, à trois étages différents (estomac, duodénum et colon), auprès de 6 patients MP et 12 contrôles (111), ou bien au niveau du plexus sous-muqueux colique avec deux études portant au total sur 58 patients MP et 30 contrôles (107,112,113). Il faut toutefois noter que, à l'inverse du SNC, la recherche de cette perte neuronale n'est pas guidée par la clinique, les zones évaluées étant donc sélectionnées de manière aléatoire ; quelle chance aurions-nous de mettre en évidence la perte neuronale centrale de la MP en sélectionnant aléatoirement les zones cérébrales ?

Pour ce qui est de l'inflammation, les argument liant MP et **inflammation digestive** sont de plus en plus nombreux et sont le fruit d'analyses à la fois génétiques, épidémiologiques et biochimiques (114) (voir chapitre III-3).

c) Symptomatologie propre à la synucléinopathie entérique

La question se pose alors de l'imputabilité de ces lésions du SNE dans la symptomatologie digestive de la MP. Concernant la sialorrhée, principalement attribuée à des troubles de déglutition, et la dysphagie oro-pharyngée, le SNE ne participent probablement pas (85) étant donné que les motoneurones qui contrôlent les muscles striés du haut œsophage proviennent du noyau ambigu (partie basse du tronc cérébral), le SNE existant au contact de ces muscles striés ayant possiblement perdu son rôle fonctionnel au cours de l'évolution chez l'homme (86).

Pour la gastroparésie, la motricité gastrique serait principalement contrôlée par une boucle vago-vagale, le rôle fonctionnel du SNE étant incertain (86) ; dans ce contexte, il apparaît plus probable que ce symptôme soit lié à l'atteinte précoce, quasi-constante et sévère du noyau dorsal moteur du vague(21), même si une implication du SNE n'est pas exclue (85).

Quant à la constipation, le rôle fonctionnel important du SNE dans la motricité et les sécrétions du petit intestin et du colon, largement indépendant du SNC, est un argument pour son implication dans ce symptôme (86). Il faut toutefois rester prudent car l'exemple du SNC montre que les symptômes de la MP sont corrélés à la perte neuronale et non pas à la charge lésionnelle en α -synucléine (15), hors aucune mort neuronale n'a jusqu'alors été démontrée de manière convaincante dans le SNE des patients parkinsoniens (voir chapitre III-2.b). L'explication alternative à ce transit ralenti serait de nouveau l'atteinte des efférences vagues, la dénervation du petit intestin et du colon ayant été documentée par imagerie nucléaire du vivant des patients (115).

3. Maladie de Parkinson, inflammation digestive et liens avec les pathologies inflammatoires de l'intestin

Le début de l'histoire entre inflammation digestive et MP pourrait remonter à 1987 avec la publication d'un court article rapportant 25 patients ayant un double diagnostic MP et **rectocolite hémorragique (RCH)**, une **maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI)**, au terme duquel l'auteur conclue que « des études épidémiologiques prospectives devraient étudier ce lien » (116).

a) Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La famille des MICI est en fait composé de deux pathologies que sont la **maladie de Crohn (MC)** et la RCH. Les deux entités correspondent à une inflammation digestive destructrice qui évolue

par poussée et peut conduire à des interventions chirurgicales pour rétablir la fonctionnalité digestive. Mais plusieurs éléments les distinguent.

Dans la MC, tous les segments du tube digestif peuvent être atteints de manière multifocale, même si les lésions surviennent plus fréquemment au niveau de l'iléon terminal et du colon. Les lésions inflammatoires sont dites transmurales, ce qui signifie qu'elles concernent l'entièreté de l'épaisseur de la paroi digestive, de la muqueuse jusqu'aux couche musculaires externes. Le diagnostic est habituellement fait entre les 2^{ème} et 4^{ème} décades. Sur le plan épidémiologique, l'incidence de la maladie est maximale dans les zones urbaines des pays riches occidentaux, le tabac est un facteur de risque important (117).

Dans la RCH, les lésions inflammatoires débutent au niveau rectal et peuvent s'étendre de proche en proche aux parties proximales voire distales du colon. Contrairement à la MC, l'inflammation reste localisée à la muqueuse digestive. Le diagnostic est généralement légèrement plus tardif, entre 30 et 40 ans. Sur le plan épidémiologique, l'incidence de la maladie est maximale dans les mêmes pays que la MC, en revanche la relation au tabac est plus complexe puisque le tabagisme actif est un facteur protecteur alors que le tabagisme sevré est un facteur de risque (118).

Bien que la physiopathologie soit différente entre ces deux pathologies, les mêmes **acteurs** sont tout de même incriminés ; une interaction altérée aurait lieu entre le **système immunitaire** de l'hôte et son **microbiote** au travers de la **barrière épithéliale intestinale**, conduisant à une réaction immunitaire aberrante. Les déterminants de cette interaction pathologique sont, comme bien souvent, d'origine à la fois environnementale et génétique (117,118). Le **SNE** est également évoqué comme acteur potentiel de ces pathologies : en effet, celui-ci est morphologiquement altéré dans les MICI, et neurones comme cellules gliales entériques sont en mesure d'interagir avec le système immunitaire (119).

b) Liens génétiques entre MP et MICI

Le premier rapprochement de 1987 entre MP et MICI n'obtient pas d'écho auprès de la communauté scientifique (114), et c'est la génétique qui, des années plus tard, relancera l'intérêt pour cette association inattendue. En 2007 tout d'abord, trois polymorphismes du gène **CARD15/NOD2**, initialement liés à la MC, sont rapportés comme étant sur-représentés chez 308 patients parkinsoniens (24% vs 15,5% des 220 contrôles) (120).

En 2008 puis 2011 ensuite, deux méta-analyses indépendantes visant à identifier des déterminants génétiques, de la MC pour la première (121) ou communs aux MICI pour la deuxième

(122), font toutes les deux apparaître un même variant représentant un locus contenant notamment le gène *LRRK2*.

C'est en 2018 que *LRRK2* sera plus sérieusement impliqué dans la MC : Hui *et al.* séquentent l'exome de plus de 1000 patients Crohn appartenant à la population juive Ashkénaze dans laquelle la MC est très fréquente, ils confirment alors des gènes précédemment incriminés dans la MC, dont *LRRK2* et *CARD15/NOD2*. Concernant *LRRK2*, les deux variants **N2081D** et **N551K/R1398H** sont respectivement identifiés comme facteur de risque et facteur protecteur. Ils valident ensuite ce résultat sur une plus grande cohorte, qui n'est cette fois-ci pas uniquement composé de juifs Ashkénazes, en intégrant également des patients parkinsoniens : les deux variants sont à nouveau **associés à la MC, mais aussi à la MP** et avec des effets communs (bien que moins importants pour la MP) (123).

c) Liens épidémiologiques entre MP et MICI

En parallèle de ces avancées génétiques, quatre études basées sur des données nationales (Taïwan, Etats-Unis, Danemark et Suède) rapportent l'association des MICI avec la MP (voir tableau 1), une méta-analyse synthétisant ces données (plus de 250 000 cas de MICI pris en compte) conclue à un sur-risque de MP d'environ 30% en cas de RCH ou MC (124). Un résultat très intéressant provient d'une analyse secondaire de l'étude États-unienne dans laquelle les patients MICI traités par anti-TNF α (une biothérapie qui inhibe l'effet du TNF α et s'avère un traitement de fond efficace dans les MICI) affichent un taux d'incidence de MP diminué de 80% (125), suggérant un effet protecteur majeur du blocage de l'inflammation systémique sur le risque de MP.

Country	Period	IBD cases	HR CD/C	HR UC/C
Denmark	1977–2014	76,477	1.12 (0.89–1.40)	1.35* (1.20–1.52)
Sweden	2002–2014	39,652	1.6* (1.1–2.3)	1.4* (1.2–1.8)
US	2000–2016	144,018	1.26* (1.03–1.53)	1.31* (1.14–1.51)
Taiwan	2000–2011	8373	1.4* (1.11–1.77)	0.94 (0.49–1.84)

Tableau 1 : Résultats des quatre études épidémiologiques sur le lien entre MP et MICI à partir des bases de données nationales. D'après Rolli-Derkinderen *et al.* (114). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses ; * : statistiquement significatif ; HR : hazard ratio ; IBD : inflammatory bowel diseases ; UC : ulcerative colitis ; CD : Crohn's disease ; C : control ; US : United-States.

d) Liens moléculaires entre MP et MC

En plus des éléments génétiques et épidémiologiques, une étude biochimique vient compléter le lien entre MP et MC : l'analyse de biopsies coliques de patients **Crohn** montre une augmentation du niveau d'expression de l' **α -synucléine** par rapport à des sujets témoins, sans argument toutefois pour l'existence de formes agrégées (126).

e) Inflammation digestive dans la maladie de Parkinson

Les données des premières études génétiques qui ont montré un lien potentiel entre MP et MICI ont incité plusieurs équipes à étudier l'existence d'une inflammation digestive dans la MP. En quantifiant les ARNm de quatre **cytokines pro-inflammatoires** (TNF- α , IL-6, IL-1 β et INF- γ) dans des biopsies coliques, Devos *et al.* ont montré une augmentation de leur niveau d'expression chez des sujets parkinsoniens par rapport à des sujets témoins (voir figure 6) ; le niveau d'expression de ces cytokines était inversement corrélé à la durée d'évolution de la maladie (93). Quelques années plus tard, des résultats cohérents sont obtenus par une autre équipe qui retrouve une augmentation des transcrits de l'IL-1 β et de l'INF- γ dans des biopsies sigmoïdiennes de patients parkinsoniens parmi une cinquantaine de gènes testés (127). Toujours à partir de biopsies coliques, une surexpression de l'enzyme pro-inflammatoire **COX-2** (*cyclooxygenase-2*) est également rapportée chez les patients MP (128).

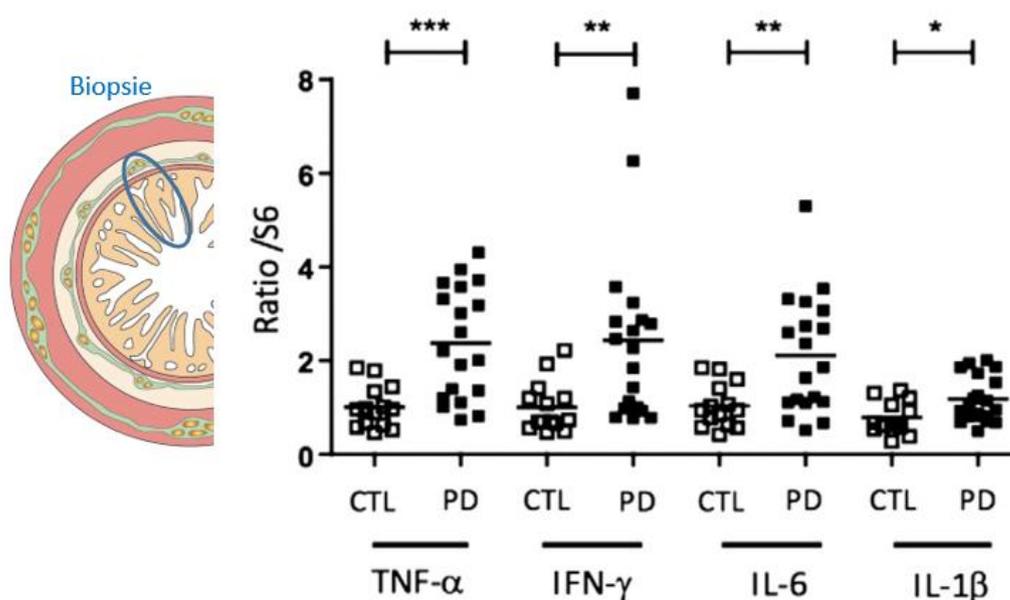


Figure 6 : Inflammation colique dans la MP. Adapté de Devos *et al.* (93). Augmentation significative de l'expression génique de TNF- α , INF- γ , IL-6 et IL-1 β dans les biopsies coliques de 19 patients parkinsoniens vs 14 témoins appariés en âge ($p=0.0005$, 0.004 , 0.001 et 0.02 respectivement).

Enfin, l'analyse des selles de patients parkinsoniens plaide aussi en faveur d'une inflammation digestive dans la MP : une équipe rapporte une augmentation d'IL-1 (α et β) et de **CRP** (*c-reactive protein*) (129), tandis que deux équipes indépendantes montrent une augmentation de la **calprotectine** (130,131).

f) Rôles possibles de l'inflammation digestive dans la MP

La question de l'origine et des conséquences de cette inflammation digestive dans le cadre de la MP reste sujet à débat. Trois scénarii sont discutés (114) (voir figure 7).

Dans les deux premiers scénarii, l'inflammation digestive est en amont de l'atteinte du SNC, son origine se situant probablement, à l'image des modèles physiopathologiques des MICI (voir chapitre III-3.a), dans un défaut d'interaction entre le système immunitaire (132), la barrière épithéliale digestive (133), le microbiote (134) et le SNE (voir chapitre III-2.a), tous les quatre altérés dans la MP.

Une **première hypothèse** est que l'**inflammation digestive** participe au rôle du pathogène décrit par Braak (voir chapitre II-2) et qu'elle serait **impliquée dans la formation de l' α -synucléine entérique pathologique** qui se transmet ensuite par effet « prion » au SNC via le nerf vague (voir figure 7a). Le fait que de l' α -synucléine pathologique générée (gavage à la roténone) ou injectée dans la paroi intestinale de rats puisse se propager au SNC via le nerf vague appuie ce scénario (135,136) ; mais il faut tempérer ces arguments devant leur manque de reproductibilité (gavage à la roténone) (23) et devant la mise en évidence, notamment sur des modèles primates, que l' α -synucléine pathologique peut aussi transiter en sens inverse (du SNC vers le tube digestif) (137). De plus, cette première hypothèse n'est pas supportée par une partie des données récentes qui montrent que la présence d'une inflammation digestive n'est globalement pas associée à un métabolisme pathologique de l' α -synucléine (notamment une surexpression) que ce soit chez l'homme, en-dehors de la MC avec les patients RCH (126), chez les souris DSS (dextran sodium sulfate, voir chapitre IV-3.c) (138,139), ou sur des cultures de SNE traitées par des cocktails de cytokines pro-inflammatoires (138). On rappelle au passage que l' α -synucléine pathologique issue du système nerveux autonome périphérique n'a, contrairement à celle issue du SNC, pas montré de capacité à induire une synucléinopathie (109) et que l'appendice iléo-caecal contient naturellement de l' α -synucléine avec des caractéristiques biochimiques pathologiques sans déclencher de trouble particulier (110).

Une **seconde hypothèse** est que l'**inflammation digestive** est responsable d'une **inflammation systémique** qui se transmet au SNC, notamment par voie humorale et rupture de la barrière hémato-encéphalique, la **neuro-inflammation** déclenchant/aggravant la

neurodégénérescence (figure 7b). Des éléments en faveur chez l'homme sont le fait que le diagnostic de MICI précède de plusieurs années celui de MP (voir chapitres II-1 et III-3.a), ainsi que la mise en évidence d'inflammation systémique (26) et d'une hyperperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (140) chez les patients parkinsoniens. Chez l'animal, il a été montré qu'une neuro-inflammation peut effectivement aggraver la mort neuronale induite par la neurotoxine 6-OHDA(141), voire l'induire directement (injection intra-cérébrale de LPS) (142). De même, une colite au DSS, aiguë (142) ou chronique (139), peut isolément être responsable d'une inflammation et d'une perte neuronale dopaminergique de la substance noire.

Dans une **dernière hypothèse**, l'**atteinte du SNC** se situerait **en amont de l'inflammation digestive**. Cette atteinte entrainerait un dysfonctionnement des efférences vagales à destinée digestive qui exercent un effet anti-inflammatoire (figure 7c). Cette hypothèse est appuyée par la dénervation parasympathique digestive mise en évidence chez les patients parkinsoniens (115) ainsi que par l'inflammation digestive identifiée chez les rats 6-OHDA (139), dont les efférences cholinergiques vagales à visée digestive sont altérées (143), ou chez les rats vagotomisés (139).

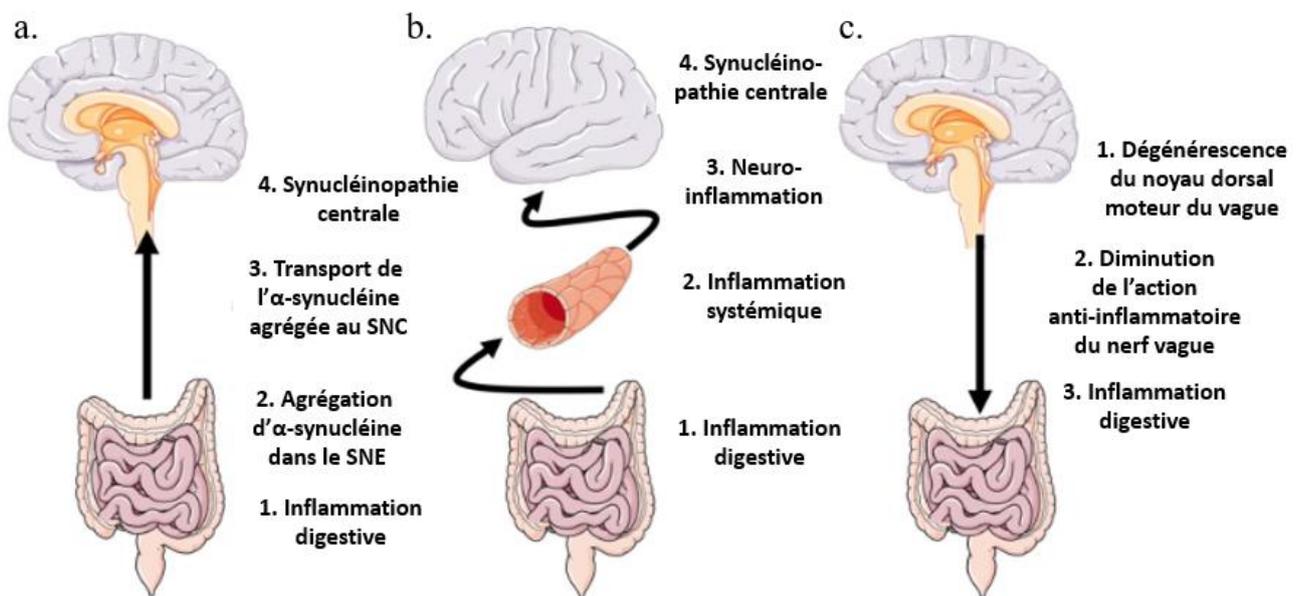


Figure 7 : Trois scénarii pouvant expliquer le lien entre MP et inflammation digestive. Traduit de Rolli-Derkinderen *et al.* (114). a. L'inflammation digestive participe à la genèse d' α -synucléine entérique pathologique qui se transmet ensuite au SNC via le nerf vague. **b.** L'effet de l'inflammation digestive sur le SNC passe par une inflammation systémique. **c.** L'inflammation digestive est consécutive d'un défaut des efférences vagales anti-inflammatoires.

IV- LRRK2 au-delà de la Maladie de Parkinson

1. Autres implications pathologiques

Bien que principalement incriminée dans la physiopathologie de la MP, LRRK2 a également été pointée du doigt comme jouant un rôle dans d'autres pathologies qu'elles soient de nature inflammatoire, oncologiques ou neurodégénératives.

a) Pathologies inflammatoires extra-digestives

Du côté des pathologies inflammatoires, *LRRK2* a été associé au **Lupus érythémateux disséminé** (LED). Il s'agit d'une pathologie dysimmunitaire, dont la physiopathologie est encore mal comprise (anomalie dans la cascade du complément, défaut d'élimination des corps apoptotiques ou encore dérégulation des lymphocytes B et T), qui est responsable d'atteintes multi-systémiques (cutanéomuqueuse, rénale, du système nerveux central ou périphérique, *etc.*) (144). En testant l'association de quelques variants identifiés comme liés aux maladies auto-immunes sur deux cohortes de plus de 1000 patients (500 LED et 500 contrôles), une première équipe chinoise a montré qu'**un variant de LRRK2** était significativement **associé** au groupe LED. Le polymorphisme incriminé serait responsable d'une augmentation de l'expression de *LRRK2*, et les auteurs rapportent justement que les globules blancs sanguins mononucléés des patients LED surexpriment *LRRK2* (35)(145). Une seconde équipe chinoise rapporte que cette **surexpression de LRRK2** est spécifique au **lymphocytes B** et qu'elle corrèle bien avec différents paramètres de la maladie. Ils concluent l'article en montrant que le KO de *LRRK2* a un effet protecteur sur un modèle murin de LED (146).

Toujours dans le registre inflammatoire, la **Lèpre** est une maladie liée à l'infection granulomateuse chronique de la peau et des nerfs périphériques par la bactérie intra-cellulaire *Mycobacterium leprae* ; la symptomatologie est en partie liée à la réponse immunitaire de l'hôte (147). Plusieurs études en GWA (genome-wide association) ont montré des associations entre Lèpre et polymorphismes représentant un locus incluant *LRRK2*, mais ces premiers résultats ne se sont pas avérés cohérents entre eux alors même qu'ils reposaient sur de petits effectifs (41). L'équipe de Fava *et al.* a changé d'approche avec l'hypothèse que **LRRK2 serait lié**, non pas au fait de contracter l'infection, mais à une **complication inflammatoire aiguë** de celle-ci. Ils ont resserré l'étude génétique sur le locus de *LRRK2* entre plus de 1000 patients, ayant ou non expérimenté la complication, et ont identifié que celle-ci survenait plus fréquemment chez les porteurs d'un variant M2397T (domaine WD40), déjà incriminé dans les MICI (148). Dans une seconde étude similaire, le même groupe a montré cette fois que l'absence de complication inflammatoire aiguë est associée à

un autre variant de *LRRK2*, R1628P, qui a un impact *in vitro* sur la réaction cellulaire aux micro-organismes pathogènes (augmentation de production des espèces réactives de l'oxygène notamment) (149).

b) Cancers

Du côté de l'oncologie maintenant, plusieurs publications sur différents types de cancer évoquent un **rôle de *LRRK2*** qui pourrait être **variable selon le type de tumeur étudié**. La première en date identifiée remonte à 2015, elle exploite la base de données The Cancer Genome Atlas (TCGA) en cherchant si des gènes liés à l'autophagie sont mutés ou différentiellement régulés dans différents types de cancer. L'équipe identifie, entre autres gènes, *LRRK2* comme étant sous-exprimé dans les tumeurs de **carcinome mammaire**, de carcinome épidermoïde pulmonaire et d'adénocarcinome pulmonaire (150). Une étude de 2021 du même groupe montre par la suite que la sous-expression de *LRRK2* est associée à une moindre survie des patients ayant un **adénocarcinome pulmonaire**, et que le KO de *LRRK2* a un effet pro-tumorigène sur un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire (151).

Allant dans le même sens, une étude de 2019, qui exploite cette même base TCGA, identifie *LRRK2* comme l'un des six gènes les plus connectés aux gènes différentiellement exprimés dans les **carcinomes épidermoïdes pulmonaires** ; ils rapportent sur ces mêmes données que les patients exprimant fortement *LRRK2* ont une survie à 10 ans supérieure à ceux l'exprimant faiblement (45 vs 35%) (152).

Une autre étude de 2021 analyse des cas familiaux de **mésothéliomes malins** et identifie 2 cas, sur 13 patients, porteurs d'une mutation *LRRK2* qui concerne le site d'épissage et est responsable d'une protéine théoriquement tronquée. En faisant appel à la base de données TCGA, ils identifient trois nouvelles mutations de *LRRK2* intra-tumorales, avec effet « perte de fonction » (deux délétions du gène et une responsable d'une protéine tronquée), dans environ 5% des cas de mésothéliomes malins (sur 80 référencés) ; ils notent également une expression très faible de *LRRK2* (confirmée au niveau protéique) dans plus de 50% des cultures primaires et lignées de mésothéliomes malins, concluant justement que l'expression de *LRRK2* pourrait avoir dans ce cas un rôle suppresseur de tumeur (153).

Enfin deux dernières études apportent des données différentes. La première s'intéresse à une cinquantaine de patients porteurs de **cholangiocarcinomes intrahépatiques** qui sont divisés en deux groupes selon l'expression forte ou faible de *LRRK2* en immunohistochimie ; une expression forte de *LRRK2* s'avère associée à un mauvais pronostic avec un risque accru de récurrence, en cohérence

avec les données *in vitro* de lignée cellulaire dont les capacités de prolifération et de migration sont diminuées par un KD de *LRRK2* (154).

La deuxième s'intéresse elle au **carcinome rénal à cellules claires**. Dans ce cas, *LRRK2* est surexprimé au sein de la tumeur (validé au niveau protéique), mais cette fois-ci un haut niveau d'expression est associé à une meilleure survie, ce qui est en contradiction avec leur données *in vitro* dans lesquelles le KD de *LRRK2* dans leurs lignées de carcinome rénale à cellules claires inhibe les capacités de prolifération (155).

c) Protéinopathies

En dehors de la synucléinopathie de la MP, un rôle de *LRRK2* est aussi évoqué dans d'autres protéinopathies du SNC. En effet, dès les études princeps d'identification de *LRRK2*, il a été mis en évidence que les patients ayant une **MP en lien avec une mutation *LRRK2*** sont porteurs une **protéinopathie non homogène**, et ce même au sein d'une même famille (30,156), alors qu'ils présentent par ailleurs des caractéristiques cliniques proches de ceux porteurs d'une forme idiopathique (157). Ces premières constatations ont été confirmées par la suite : sur une revue de 55 résultats d'autopsie, Schneider et Alcalay rapportent des dépôts d' **α -synucléine** dans plus de la moitié des cas (quasi-exclusivement de type MP, particulièrement fréquents pour G2019S, de type Atrophie multi-systématisé chez 1/8 I2020T), de protéine **Tau** dans la moitié des cas (de type Paralyse supranucléaire progressive ou Maladie d'Alzheimer), et plus rarement de **TDP-43** (mais recherchés de manière moins systématique) (158) ; restent des cas présentant des dépôts non identifiés (positifs pour l'**ubiquitine**) (158), ainsi que d'autres pour lesquelles **aucune protéinopathie** n'est mise en évidence, comme c'est le cas pour 4/4 porteurs des mutation R1441G/H (159,160) et 6/8 porteurs de I2020T (156). Ces constatations posent la question d'un éventuel rôle de *LRRK2* en amont des cascades pathologiques pouvant conduire aux différentes protéinopathies.

d) Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Enfin, d'un intérêt particulier pour cette thèse, *LRRK2* a également été décrit comme lié aux MICI, de manière plus robuste pour la MC que pour la RCH (voir chapitre IV-3). *LRRK2* est donc impliqué dans la physiopathologie des MC et MP qui, bien que de présentations radicalement différentes, partagent une part de phénotype commun au niveau du tube digestif caractérisé par une inflammation et une altération du métabolisme de l' α -synucléine. Cette double implication, avec le tube digestif en lieu commun, pose la question du rôle de *LRRK2* entérique.

2. Physiologie de LRRK2 dans l'appareil digestif

Peu de travaux se sont intéressés à LRRK2 au niveau du tube digestif. La première étude disponible est celle de Gardet *et al.* en 2010 dans laquelle des biopsies coliques de patients MC et RCH ont été analysées. Des immuno-marquages sont réalisés permettant de localiser LRRK2 dans certains sous-types de cellules immunitaires (lymphocytes B, cellules dendritiques et macrophages) de la sous-muqueuse. A l'occasion de cette première analyse, les auteurs précisent que le marquage LRRK2 « n'est pas visualisé dans les neurones entériques » (60) (figure 8a). Une deuxième étude de 2015 identifie chez la souris une expression de *Lrrk2* dans un sous-type de cellules de l'épithélium digestif, les cellules de Paneth (161). En 2017, une troisième étude s'est intéressée plus particulièrement à *Lrrk2* dans le SNE. En utilisant des souris sauvages et KO pour *Lrrk2*, il a été montré que *lrrk2* est exprimée dans le plexus myentérique (figure 8b) et qu'elle a un effet régulateur sur l'expression de certains neuropeptides, ainsi que sur la production d'immunoglobuline A (162). Enfin, une dernière étude de 2020 rapporte une analyse de transcriptomique nucléaire à résolution cellulaire du colon humain et murin. Chez la souris, *Lrrk2* est identifié comme l'un des gènes dont l'expression augmente le plus avec l'âge dans les neurones entériques, chez l'homme son expression est rapportée comme étant principalement macrophagique, un peu gliale et limitée à quelques sous-types de neurones ; en comparaison des neurones corticaux, *LRRK2* serait moins exprimé dans les neurones entériques (163).

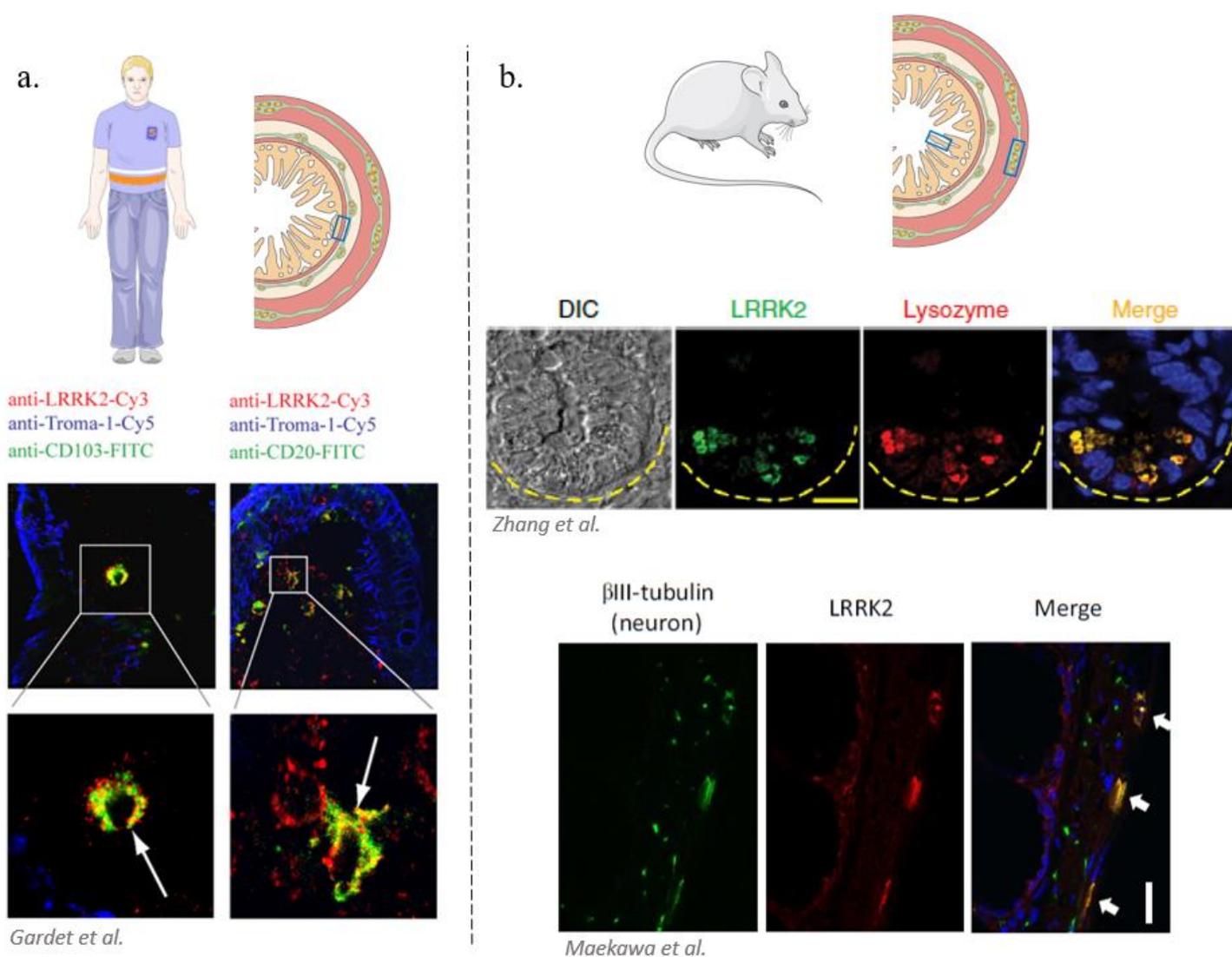


Figure 8 : Expression de LRRK2 dans la paroi digestive. a. Données chez l'homme : une seule étude sur biopsies de patients MICI localise l'expression de LRRK2 dans les macrophages, cellules dendritiques (CD103) et lymphocytes B (CD20) de la sous-muqueuse. Adapté de Gardet *et al.* (60). **b.** Données chez la souris : une première étude met en évidence Lrrk2 dans les cellules de Paneth (lysosome), tandis qu'une deuxième localise Lrrk2 dans les ganglions myentériques (β III-tubulin). Adapté de Zhang *et al.* (161). puis Maekawa *et al.* (162).

3. Liens avec les pathologies inflammatoires de l'intestin

Comme évoqué précédemment (voir chapitre III-3.b), *LRRK2* est lié aux MICI, principalement sur des arguments génétiques, mais aussi quelques éléments biochimiques.

a) Recto-colite hémorragique

En ce qui concerne la RCH, ce premier argument génétique provient d'une méta-analyse de 2011 qui incrimine un locus contenant notamment le gène *LRRK2* (122). Une deuxième étude récente (2021) s'est concentrée sur un variant donné de *LRRK2* dont il a été montré qu'il est responsable

d'une augmentation de l'expression de *LRRK2* (validée au niveau protéique) dans les cellules immunitaires dérivées de patients (164) ; ce variant s'avère deux fois plus fréquent (36,7 vs 15,5%) chez les patients RCH (environ 80 vs 60 sujets contrôles) et les auteurs rapportent également une augmentation de l'expression de *LRRK2* dans le sang des patients RCH, d'autant plus importante en cas d'activité de la maladie (165).

b) Maladie de Crohn

Concernant la MC maintenant, les arguments semblent plus aboutis. Les deux méta-analyses indépendantes précitées de 2008 et 2011 identifient le même variant représentant un locus contenant notamment le gène *LRRK2* (121,122). En 2010, Gardet *et al.* évaluent l'expression de *LRRK2* dans des biopsies de patients Crohn, en comparant les zones macroscopiquement inflammées avec les saines, et rapportent une surexpression dans ces zones lésées sur 18 patients ; ils font la même analyse chez 11 patients RCH mais ne retrouvent pas de différence entre les zones saines et lésées. En 2018 Hui *et al.* confirment sur deux cohorte indépendantes deux variants de *LRRK2*, N2081D et N551K/R1398H, qui sont respectivement sur et sous-représentés chez les patients Crohn. Pour définitivement incriminer *LRRK2* plutôt que les autres gènes du locus identifié, ils établissent un réseau de covariance basé sur une analyse transcriptomique de 200 biopsies digestives (de l'iléon au rectum) dans lequel *LRRK2* est bien connecté à de nombreux gènes différentiellement exprimés dans la MC. Ils testent ensuite les effets fonctionnels des mutations candidates. *In vitro*, N2081D s'avère augmenter l'activité kinase, comme G2019S, tandis que R1398H augmente l'activité GTPase, à l'inverse de ce qui est décrit pour les mutations pathogènes R1441C/G ou Y1699C ; dans les macrophages issus de patients Crohn, les deux variants affichent des effets opposés en termes de régulation des microtubules et d'acidification des lysosomes (123).

c) Modèles animaux

Les résultats en provenance des modèles animaux de colite n'ont pas aidé à éclaircir le rôle de *Lrrk2* dans l'inflammation digestive. Le modèle le plus répandu pour reproduire la colite est l'ajout de DSS dans l'eau de boisson des souris ; il s'agit d'un polysaccharide qui lèse l'épithélium digestif et induit une inflammation par augmentation aberrante de la perméabilité (166). Une première étude de 2011 montre une aggravation de la colite DSS chez les souris *Lrrk2* KO. Les auteurs affinent le modèle en induisant une aplasie chez la souris non mutée et en greffant des cellules de moelle osseuse issues de souris KO *Lrrk2* ou non mutées ; l'effet est partiellement reproduit suggérant que c'est au sein des cellules myéloïdes que s'exerce cet effet pathologique du KO de *Lrrk2* (167). A l'inverse, une étude plus récente de 2018 montre que ce sont cette fois des souris transgéniques surexprimant *Lrrk2* qui développent une colite plus sévère sous DSS (164).

d) Physiopathologie de Lrrk2 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Au total, les éléments génétiques, particulièrement ceux issus des travaux de Hui *et al.*, et biochimiques (expression de *LRRK2* augmentée dans les zones inflammées du tube digestif des patients Crohn (60) et dans le sang des patients RCH (165)) plaident pour un effet « gain de fonction » pathologique de *LRRK2* dans l'inflammation digestive. En effet, les deux variants identifiés par Hui *et al.* ont un impact similaire sur le risque de MC et de MP, le rôle de *LRRK2* dans la MP étant plutôt assimilé à un gain de fonction kinase toxique. Le fait que le variant pathologique N2081D soit responsable d'un effet similaire au variant G2019S sur l'activité kinase *in vitro*, et qu'à l'inverse le variant protecteur R1398H soit responsable d'un effet opposé aux mutations pathogènes R1441C/G et Y1699C sur l'activité GTPasique *in vitro* donne un rationnel moléculaire à cette hypothèse.

Mais le fait que les expériences *in vivo* (souris DSS) ne soient pas unanimes (164,167) et qu'un variant possiblement pathogène comme M2397T semble plutôt responsable d'un effet perte de fonction sur *LRRK2* (protéine moins stable) (167) obligent à rester prudents. De plus, au même titre que la question se pose pour la neuropathie parkinsonienne (voir chapitre II-5.c), le rôle pathologique de *LRRK2* dans l'inflammation digestive pourrait venir d'un ou plusieurs agents cellulaires impliqués dans les MICI (cellules immunitaires (117), cellules de Paneth (168), SNE (119)) avec des effets possiblement radicalement différents des gains/pertes de fonction de *LRRK2* selon le type cellulaire considéré.

V- Hypothèses et objectifs

Devant l'ensemble de ces éléments, nous avons fait l'**hypothèse** que **LRRK2** pourrait être un **acteur moléculaire commun aux altérations digestives des MC et MP**. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris d'étudier le profil d'expression et de phosphorylation de *LRRK2* dans le SNE humain en conditions physiologique et pathologique (MP et MC). Les résultats obtenus sont présentés dans les articles 1 et 2. Nous avons ensuite étudié plus précisément la régulation de l'expression et de la phosphorylation de *LRRK2* dans le SNE (article 2).

Article 1



LRRK2 is reduced in Parkinson's disease gut

Adrien de Guilhem de Lataillade^{1,2} · Jérémy Verchere³ · Thibault Oullier¹ · Alice Prigent¹ · Tony Durand¹ · Carolina Pellegrini⁴ · Michel Neunlist¹ · Thierry Baron³ · Malvyne Rolli-Derkinderen¹ · Pascal Derkinderen^{1,2} 

Received: 2 April 2021 / Revised: 1 June 2021 / Accepted: 2 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Recent observations which showed that Parkinson's disease (PD) and Crohn's disease (CD) are epidemiologically and genetically linked reinforce the assumption that the gastrointestinal (GI) tract is implicated in PD pathogenesis [5]. With regard to genetics, several studies identified the Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) gene, which is the gene most commonly associated with both familial and sporadic PD, as a major susceptibility gene for CD [5]. These observations suggest that *LRRK2* may sit at the crossroads of GI inflammation, PD, and CD.

LRRK2 is a ubiquitously expressed multi-domain kinase, which is phosphorylated at multiple sites to affect its physiological and pathological functions [1]. It has been shown that *LRRK2* mRNA is upregulated in immune cells in the lamina propria in CD intestinal tissue [3], but no data are available about the expression and phosphorylation levels of *LRRK2* in the GI tract in PD. Here, we first examined the expression levels of *LRRK2* in the adult human colonic enteric nervous system (ENS) (Supplementary File 1, online

resource), and then, we studied its expression, kinase activity, and phosphorylation profile in sigmoid colon biopsy specimens from PD patients and compared it to samples from controls and CD patients (Supplementary Tables 1, 2 and File 1, online resource). Additional experiments were performed in mutant human alpha-synuclein transgenic mice and in mice with chronic DSS-induced colitis (Supplementary file 1, online resource).

Western blot and immunohistochemistry experiments showed that *LRRK2* is expressed in both human colonic submucosal and myenteric plexuses (Fig. 1a). When sigmoid colon biopsies were analyzed, a $\approx 50\%$ decrease in the expression levels of *LRRK2* protein was observed in PD samples relative to controls (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1, online resource) with *LRRK2* protein and mRNA levels showing significant positive correlation (Supplementary Fig. 2a, online resource). There were no differences in age, biopsy storage time, or levels of IL-1 β and IFN- γ between PD patients and controls, and no correlation between lifetime dose of levodopa and *LRRK2* levels (Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 2b, online resource). In contrast, a marked increase in *LRRK2* was observed in CD

Malvyne Rolli-Derkinderen and Pascal Derkinderen are equal contributors.

✉ Pascal Derkinderen
pascal.derkinderen@univ-nantes.fr; derkinderenp@yahoo.fr

Adrien de Guilhem de Lataillade
adrien_dgdl@live.fr

Jérémy Verchere
jeremy.verchere@anses.fr

Thibault Oullier
thibault.oullier@univ-nantes.fr

Alice Prigent
prigent.alice@gmail.com

Tony Durand
tony.durand@univ-nantes.fr

Carolina Pellegrini
carolina.pellegrini87@gmail.com

Michel Neunlist
michel.neunlist@univ-nantes.fr

Thierry Baron
thierry.baron@anses.fr

Malvyne Rolli-Derkinderen
malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr

¹ Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France

² Department of Neurology, CHU Nantes, Inserm U1235 Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

³ French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety (ANSES), University of Lyon, Lyon, France

⁴ Department of Pharmacy, University of Pisa, Pisa, Italy

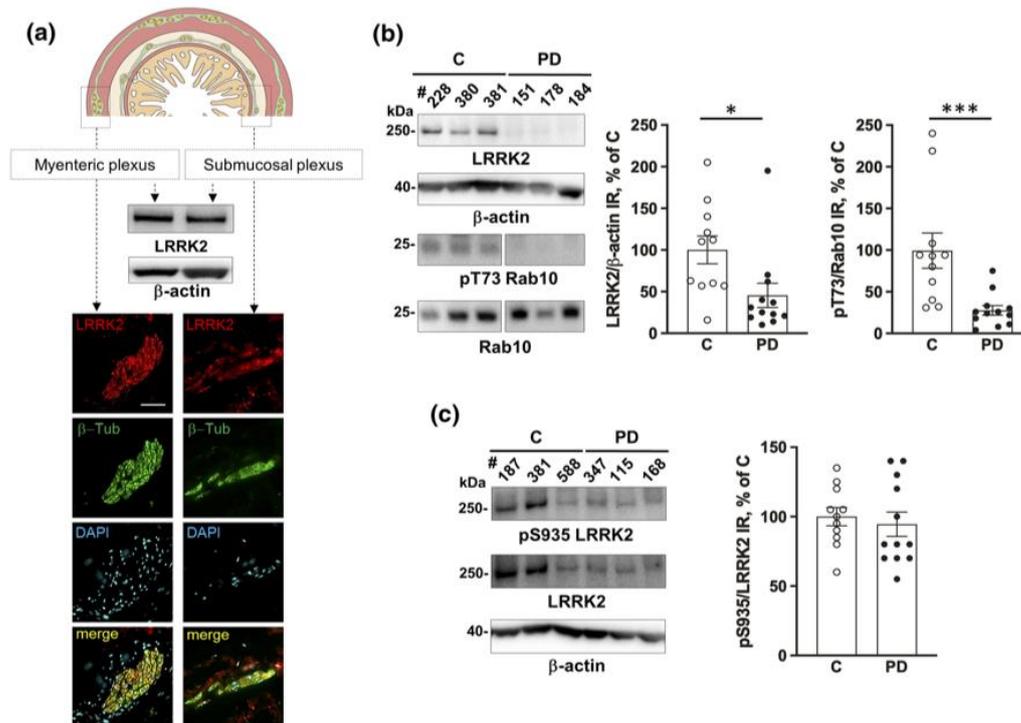


Fig. 1 Expression levels, activity, and phosphorylation status of LRRK2 in the ENS in PD. **a** Lysates from dissected human colon from 2 control subjects, which contains the submucosal and myenteric plexuses, were analyzed by Western blot using LRRK2 antibody. Colonic tissues from 8 additional control subjects were stained to examine the localisation of LRRK2 in the myenteric and submucosal ganglia (Supplementary File 1, online resource). Representative photomicrographs are shown. Scale bar is 50 μ m. **b, c** Sigmoid biopsy

lysates from 12 PD patients and 11 controls (**c**) (supplementary table 1, online resource) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against LRRK2, LRRK2 phosphorylated at Ser935 (pS935 LRRK2), Rab10 and Rab10 phosphorylated at Thr73 (pT73 Rab10). Raw immunoblots are provided in Supplementary Fig. 1 (online resource). Quantification was performed as described in Supplementary File 1 (online resource). All data correspond to mean \pm SEM, * p < 0.05 and *** p < 0.001

colonic biopsies (Supplementary Fig. 3a, b, online resource); this was associated with an upregulation of IL-1 β and IFN- γ (Supplementary Fig. 4, online resource). LRRK2 phosphorylation of Rab10 at Thr73 is commonly used to monitor its kinase activity [1]. When biopsies were analyzed with a Rab10 phosphospecific antibody, the amount of Rab10 phosphorylated at Thr73 was significantly lower in PD compared to controls (Fig. 1b). The phosphorylation of LRRK2 at Ser935 plays a key role in its cellular localisation [2], but no difference was observed between PD and controls when this site was analyzed (Fig. 1c). The results obtained in two animal models corroborated the findings we obtained with human samples. LRRK2 expression was significantly lower in the colon of aged alpha-synuclein transgenic mice when compared to 1-month-old mice, while mice challenged with DSS had more colonic LRRK2 than untreated animals (Supplementary Fig. 5, online resource).

Our research is the first to study LRRK2 in the PD gut and we show that both LRRK2 expression and kinase

activity are significantly reduced in the colon of PD patients. These results are in sharp contrast with those obtained from CD gut, in which LRRK2 is upregulated in inflamed areas (current study and [3]). In addition, and in keeping with previous findings obtained in mice [4], we also show that the distribution of LRRK2 in the human GI tract is not limited to the immune cells [3] but also extends to the two main plexuses of the ENS. The discrepancy observed in enteric LRRK2 expression between PD and CD suggests that these two disorders, despite their genetic links, differ mechanistically; this might explain why epidemiological associations between CD and PD are minor [5]. Future research should be conducted to investigate the transcriptional regulation of LRRK2 and to elucidate the possible role of LRRK2 downregulation in the ENS in PD.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02334-y>.

Acknowledgements This work was supported by grants from Institut des Neurosciences Cliniques de Rennes (INCR), *centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens* (CECAP), and *Parkinsonien de Vendée et du Maine et Loire* (FFGP) to ADGDL and PD.

Author contributions ADGDL, JV, TO, AP, and TD performed the experiments. TO and MRD managed tissue sampling and biobanking. MN, MRD, TB, and PD supervised the study. CP provided critical feedback and helped shape the research. PD and ADGDL wrote the first draft and the final version of the manuscript.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no actual or potential conflict of interest.

References

1. Berwick DC, Heaton GR, Azegagh S, Harvey K (2019) LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener* 14:49
2. Dzamko N, Deak M, Hentati F, Reith AD, Prescott AR, Alessi DR et al (2010) Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochem J* 430:405–413
3. Gardet A, Benita Y, Li C, Sands BE, Ballester I, Stevens C et al (2010) LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J Immunol* 185:5577–5585
4. Maekawa T, Shimayama H, Tsushima H, Kawakami F, Kawashima R, Kubo M et al (2017) LRRK2: an emerging new molecule in the enteric neuronal system that quantitatively regulates neuronal peptides and IgA in the gut. *Dig Dis Sci* 62:903–912
5. Rolli-Derkinderen M, Leclair-Visonneau L, Bourreille A, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P (2020) Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J Neurol* 267:2207–2213

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary table 1. Demographic and biopsy data for PD patients and controls. Age: age at which the colonoscopy was performed. DD: disease duration, time between diagnosis and endoscopy (years). Sigmoid/colon: biopsies taken at the junction of sigmoid and descending colon. PSP: progressive supranuclear palsy. Levodopa: approximation of the cumulative dose of L-Dopa (mg) was calculated as previously described by Parkkinen and collaborators [7]. N/A: not available. PASH (Phospho-alpha-synuclein histopathology): number of positive biopsy(ies). Age and biopsy storage time are not different between controls and PD patients (63 ± 9.1 vs 61 ± 9.2 , $p=0.54$ and 8.0 ± 2.2 vs 7.2 ± 3.5 , $p=0.36$, respectively; both in years, mean \pm SD); the expression levels of LRRK2 protein (IR, % of controls) are not different between PASH+ and PASH- subjects (24 ± 11 vs 40.4 ± 12 , $p=0.36$), however this might be due to a lack of statistical power due to the small sample size. There is no correlation between the cumulative dose of L-Dopa and the expression levels of LRRK2 ($r=-0.15$, $p=0.67$)

Subject #	Diagnosis	Age	Sex	Biopsy site	Storage time (years)	Levodopa (mg)	DD (years)	PASH
115	PD	68	F	Sigmoid/Colon	11	1793797	19	- (0/2)
151	PD	44	F	Sigmoid/Colon	11	0	1	- (0/2)
168	PD	55	F	Sigmoid/Colon	9	1697917	9	- (0/2)
177	PD	70	F	Sigmoid/Colon	9	1188174	9	+ (2/2)
178	PD	53	F	Sigmoid/Colon	9	0	3	+ (2/2)
184	PD	54	F	Sigmoid/Colon	9	617384	4	+ (2/2)
323	PD	58	M	Sigmoid/Colon	7	1533000	9	+ (2/2)
324	PD	72	F	Sigmoid	7	NA	14	- (0/2)
340	PD	69	F	Sigmoid/Colon	6.5	3759500	28	+ (2/2)
347	PD	58	F	Sigmoid/Colon	6.5	0	3	- (0/2)
400	PD	58	M	Sigmoid/Colon	0.5	3650000	10	N/A
401	PD	73	M	Sigmoid/Colon	0.5	109500	3	N/A
143	C	50	M	Sigmoid	11			- (0/2)
146	C	62	M	Sigmoid	11			- (0/2)
155	C	61	F	Sigmoid	10.5			- (0/2)
170	C/PSP	63	F	Sigmoid/Colon	9	1314000	3.5	- (0/2)
176	C/PSP	72	M	Sigmoid/Colon	9	584000	4	- (0/2)
187	C	75	M	Sigmoid/Colon	8.5			- (0/2)
228	C	76	F	Sigmoid/Colon	7.5			- (0/2)
341	C	70	M	Sigmoid/Colon	6.5			N/A
380	C	55	M	Sigmoid/Colon	5			- (0/2)
381	C	62	F	Sigmoid/Colon	5			- (0/2)
588	C	51	F	Sigmoid/Colon	5.5			N/A

Supplementary table 2. Demographic data for CD patients and controls. DD: disease duration. IMS: immunosuppressive agent.

Subject #	Diagnosis	Age	Sex	Storage time (years)	Treatment	Case used
244	CD	31	M	12	IMS	WB LRRK2, PCR
248	CD	45	F	12	Anti-TNF	WB LRRK2, PCR
381	CD	34	M	10	Anti-TNF	PCR
387	CD	43	F	10	Anti-TNF	PCR
409	CD	34	M	10	None for 2 years	PCR
436	CD	20	M	9	Anti-TNF	WB LRRK2, Rab10
458	CD	38	F	8	Anti-TNF+IMS	PCR
461	CD	35	M	8	Anti-TNF	WB LRRK2
516	CD	39	M	7	Anti-TNF+IMS	PCR
517	CD	22	M	7	Anti-TNF	WB LRRK2, Rab10
533	CD	24	M	6.0	None for 1 year	WB Rab10, PCR
539	CD	39	M	6.0	None	WB LRRK2, PCR
620	CD	38	F	5	IMS	PCR, WB Rab10
707	CD	50	F	3	IMS	WB LRRK2, Rab 10, PCR
190	C	51	M	11	-	WB LRRK2, PCR
191	C	64	M	11	-	WB LRRK2, PCR
194	C	63	F	11	-	WB LRRK2, PCR
212	C	52	F	11		WB LRRK2, Rab10, PCR
269	C	72	M	10		WB LRRK2, Rab10, PCR
277	C	58	M	9.5		WB LRRK2, Rab10, PCR
330	C	55	M	9.5	-	PCR
335	C	73	F	9.5	-	PCR
345	C	48	F	9.5	-	PCR
377	C	48	F	8.5	-	PCR
424	C	41	F		-	PCR
442	C	45	M	7.5	-	WB LRRK2
477	C	18	F	6.5	-	PCR

Supplementary file 1: Material and methods

Human tissues

Specimens of human colon were obtained from 10 neurologically unimpaired subjects who underwent colon resection for colorectal cancer. For all 10 tissues specimens, sampling was performed in macroscopically normal segments of uninvolved resection margins. For two out of 10 samples, colonic sections were separated into muscle and submucosal/mucosal layer, which contain the myenteric and submucosal plexus respectively, and then were frozen and kept at -80 °C until further analysis by Western blot. The 8 remaining samples were analysed by immunohistochemistry.

For experiments on LRRK2 expression in PD gut, routine sigmoid colon biopsies were obtained during sigmoidoscopy/colonoscopy from 23 subjects, 12 PD and 11 controls. All patients were recruited from the movement disorder clinic at Nantes University Hospital, France. Diagnosis of PD was made according to criteria provided by the United Kingdom Parkinson's Disease Survey Brain Bank. PD patients were all Caucasian with no family history of PD. 9/11 control subjects were healthy subjects who had a routine colonoscopy performed for colorectal cancer screening. These controls subjects underwent a detailed neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. 2/11 controls were progressive supranuclear palsy (PSP) patients who fulfilled the diagnostic criteria for possible or probable PSP. These subjects were included in the control group as, in contrast with PD, no pathological deposits [2, 6] nor inflammation [9] have been described in the gut in PSP. Biopsies were frozen and stored at -80°C until required. All these subjects, who were included in the Enterolark and ColoBioParker had two additional descending colon/sigmoid biopsies for the detection of PASH (Phospho-alpha-synuclein histopathology). Microdissection and staining were performed as previously described [4, 5, 8]; each whole-mount preparation of submucosa obtained from a single biopsy was stained with antibodies against phosphorylated aSyn (1:5,000, WAKO, Osaka, Japan) and PGP9.5 (1:10,000; Ultraclone Limited, UK). A biopsy was noted as positive (phosphorylated aSyn histopathology, PASH+) when at least one structure immunoreactive for both phosphorylated aSyn and PGP9.5 was observed.

For experiments on LRRK2 expression in CD, colon biopsies from 27 subjects, 14 CD and 13 controls were analysed.

The sampling of human colon was approved by the Fédération des biothèques of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the no. DC-2008-402. Regarding sigmoid biopsies sampling, the study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (Comité de Protection des Personnes Ouest VI), and registered on ClinicalTrials.gov (Enterolark and ColoBioParker, identifier NCT01618383 and NCT01353183, respectively). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Mouse tissues

Two mouse models were used in the current study, chronic DSS-induced colitis and M83 transgenic mice that express mutant human A53T alpha-synuclein under the direction of the mouse prion protein promoter. Chronic DSS-induced colitis is a widely used animal model of inflammatory bowel disease [3] while M83 transgenic mouse is a model of human synucleinopathies that develops severe motor impairment along with accumulation of the pathological phosphorylated alpha-synuclein in the brain and in the ENS [1]. Aggregates of phosphorylated alpha-synuclein are not detected in the ENS of young M83 mice (not before 3

months of age) [1]. Chronic colitis was induced by three cycles of 2% (w/v) Dextran Sulfate Sodium (36–50,000 kDa; MP Biomedicals, Cat# ICN216011080, France) in drinking water for 2 days followed by 5 days of tap water. Control mice received plain tap water. Samples of distal colon were taken and stored at -80°C for further analysis by Western blot. Regarding M83 transgenic mice, samples of distal colon from young (one-month-old, n=4) and aged (10, 12, 16 and 21-month old, n=4) were taken and stored at -80°C for further analysis by Western blot.

Cell line

Raw 264.7 cells (murine macrophage) were used as positive controls for LRRK2 immunoblotting

Western Blot

Two biopsies per subject were pooled and lysed in RA1 buffer using the “Precellys 24” tissue homogenizer (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) followed by sonication with “vibracell 75 186” device (Sonics, Newton CT, USA). The total proteins were precipitated and prepared for Polyacrylamide Gel Electrophoresis using protein precipitator and resuspension buffer PSB/TCEP (Protein solving buffer and (tris(2-carboxyethyl)phosphine) TCEP reducing agent) from the NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer’s instructions. Total protein was quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Cillebon sur Yvette, France).

Human colonic sections and colon samples from DSS-mice were lysed in RIPA buffer followed by sonication. Total protein was quantified using the Pierce BCA protein assay kit (23225, ThermoFisher Scientific) before adding adjusted volume of Sample Reducing Agent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) and LDS Sample Buffer (NP0008, ThermoFisher Scientific). Equal amounts of lysate were separated using either Invitrogen NuPage 3-8% Tris-Acetate Gels, together with the Tris-Acetate SDS Running Buffer (LA0041, ThermoFisher Scientific), or 10% Bis-Tris Gels, together with the 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate (MES-SDS) running buffer, before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes (25V during 9 min) with the iBlot™ Dry Blotting System also from Invitrogen (ThermoFisher Scientific). Membranes were then blocked for one hour at room temperature in TBS with 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit monoclonal anti-pS935 (1:1,000; UDD2, Abcam, Paris, France), rabbit monoclonal anti-LRRK2 (1:1,000; MJFF2, c41-2, Abcam, Paris, France), rabbit monoclonal anti-phospho-T73 (1:1,000; MJF-R21, Abcam, Paris, France), rabbit monoclonal anti-Rab10 (1:1,000; MJF-R23, Abcam, Paris, France). To confirm equal protein loading, membranes were probed with mouse monoclonal anti-β-actin antibody (1:10,000; A5441, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1:5,000; Life technologies, ThermoFisher Scientific) and visualized by enhanced chemiluminescent detection using either the Clarity ECL (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) or Supersignal West Femto (34096, ThermoFisher Scientific) substrates. For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analysed with Image Lab software (Biorad) and image J (version 1.51). To allow comparison between different films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls. LRRK2 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of β-actin and expressed as percentage of controls; pT73 rab10 immunoreactive bands were

measured, normalized to the optical densities of rab10 and expressed as percentage of controls; pS935 LRRK2 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of LRRK2 and expressed as percentage of controls. GraphPad Prism software version 9.1.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, United States) was used for statistical analysis. For statistical comparison between groups, a Mann-Whitney test was performed. All data shown are mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

Protein extracts from entire colons of M83 mice were prepared using a mechanical homogenizer (grinding balls, Precellys 24, Bertin Technologies, Montigny-le- Bretonneux, France) in high-salt salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% phosphatase and protease inhibitor cocktail). Protein concentration was measured with DC protein assay (500-0112, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The homogenates were mixed with TD4215 denaturing buffer (4% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 192 mM glycine, 25 mM Tris, 5% sucrose) and denatured for 5 min at 100°C for 5 min. 20 μ g total proteins were separated in 3-8% Tris-Acetate gels (3450130, criterion XT, Biorad) with migration buffer (1610790, XT Tricine, Biorad) during 55 min at 150 V, then transferred onto 0,45 μ m PVDF membrane (IPVH00010, Immobilon-P, Sigma) one hour at 115 Volts. The membranes were incubated with 4% (v/v) paraformaldehyde and 0.01% (v/v) glutaraldehyde in PBS for 30 min at room temperature under agitation, and were saturated one hour with 5% nonfat dry milk in 0.1% PBST (16694685, Oxoid, FisherScientific). The membranes were incubated with the primary rabbit monoclonal anti-LRRK2 (1:1,000; MJFF2, c41-2, Abcam ab8227, Paris, France) overnight at 4°C. Mouse monoclonal anti- β -actin antibody was used for loading control (1:1000; ab8227, Abcam). The primary antibody was detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or mouse antibodies (1:20,000; 4010-05 or 1010-05, Clinisciences). The signal was visualized by enhanced Supersignal West Dura (34075, ThermoFisher Scientific) substrate. For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analysed with image J (version 1.51). LRRK2 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of β -actin and expressed as percentage of young mice. GraphPad Prism software version 9.1.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, United States) was used for statistical analysis. For statistical comparison between groups, a Mann-Whitney test was performed. All data shown are mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

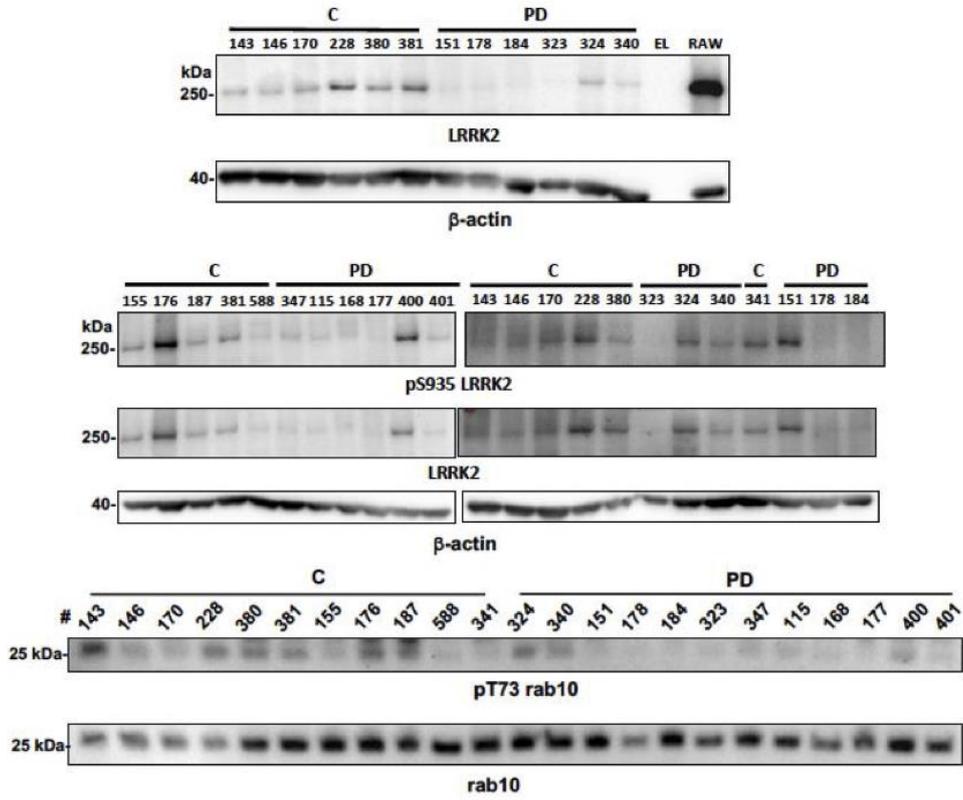
Immunohistochemistry

Fixed human tissues from one control was included in paraffin using an embedding station (LEICA EG1150C) and sections (10 μ m) were performed using a microtome (LEICA RM2255). The slides were deparaffinized with 2 xylene baths (for 10 min each) and incubated in 4 ethanol baths (100% for 5 min, 95% for 4 min, 70% for 3 min, 50% for 2 min). After two rinses in distilled water, slides were washed in PBS and antigen retrieval was performed using a Sodium Citrate solution (2.94g Sodium Citrate Tribase ; 1 L distilled water ; 500 μ L Tween 20 ; pH 6) at 95°C for 20 min. Slides were incubated in NaH₄Cl (100mM) for 15 min before incubation in PBS containing 0.5% (v/v) Triton X-100 and 10% horse serum for 1 hour. Primary antibodies, rabbit monoclonal anti-LRRK2 antibody (1:100; MJFF2, c41-2, Abcam, Paris, France) and β III-tubulin (1:250; T8660, Sigma) were incubated overnight at room temperature, then with secondary antibody at room temperature for 1 to 2 hours. Images were acquired with an AXIO Zoom.V16 fluorescence microscope (Zeiss) coupled to a digital camera (AxioCam HRm, Zeiss)

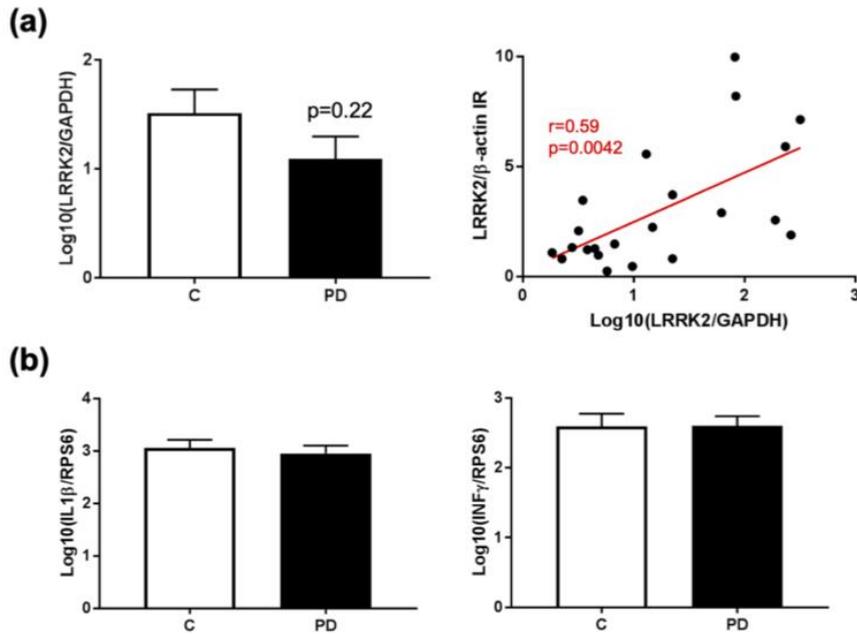
qRT-PCR

RNA extraction was performed with NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel) in two-pooled biopsies (see Western Blot section). Total RNA was quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). One μg purified mRNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). PCR amplifications were performed using either the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche) or the Taqman Gene expression Master mix (Thermo Fisher) and run on a StepOnePlus system (Thermo Fisher). With SYBR green technology, the following primers were used: LRRK2, forward: 5'GGATGTTGGTGATGGAGTT3'; reverse: 5'GGCTGAGTGGAGGTATCT3'. RPS6, forward: 5'AAGCACCCAAGATTCAGCGT3'; reverse: 5'TAGCCTCCTTCATTCTTGGC3'. IL1 β , forward: 5' GAGCAACAAGTGGTGTCTCC3'; reverse: 5' TTGGGATCTACACTCTCCAGC3'. INF γ , forward: 5' CCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAG3'; reverse: 5' GCTGGCGACAGTTCAGCCATCA3'. All data shown are mean \pm standard error of the mean (SEM). For statistical comparison between groups, a Mann-Whitney test was performed. Correlations were assessed using the spearman's rank correlation coefficient. Differences or correlation were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

Supplementary figure 1. Raw immunoblots

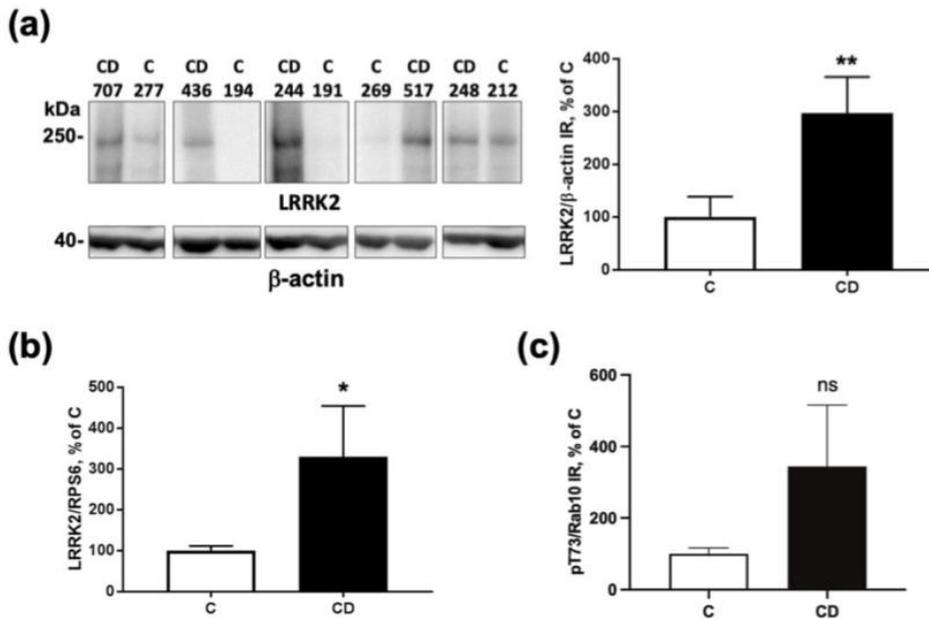


Supplementary figure 2. Expression levels of LRRK2, IL-1 β and IFN- γ mRNA in PD gut. (a) Although not significant ($p=0.22$), a decrease in the expression levels of LRRK2 mRNA is observed in sigmoid biopsies from PD patients. LRRK2 protein and mRNA levels are positively correlated ($r=0.59$; $p=0.0042$). **(b)** Expression levels IL-1 β and IFN- γ mRNA are not different between sigmoid biopsies from PD and controls. Data correspond to mean \pm SEM, $n=12$ for PD and 11 for controls.

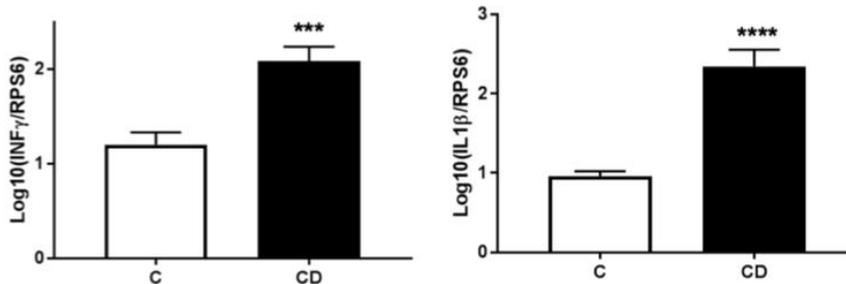


Supplementary figure 3. Expression levels of LRRK2 and Rab10 phosphorylation in CD gut.

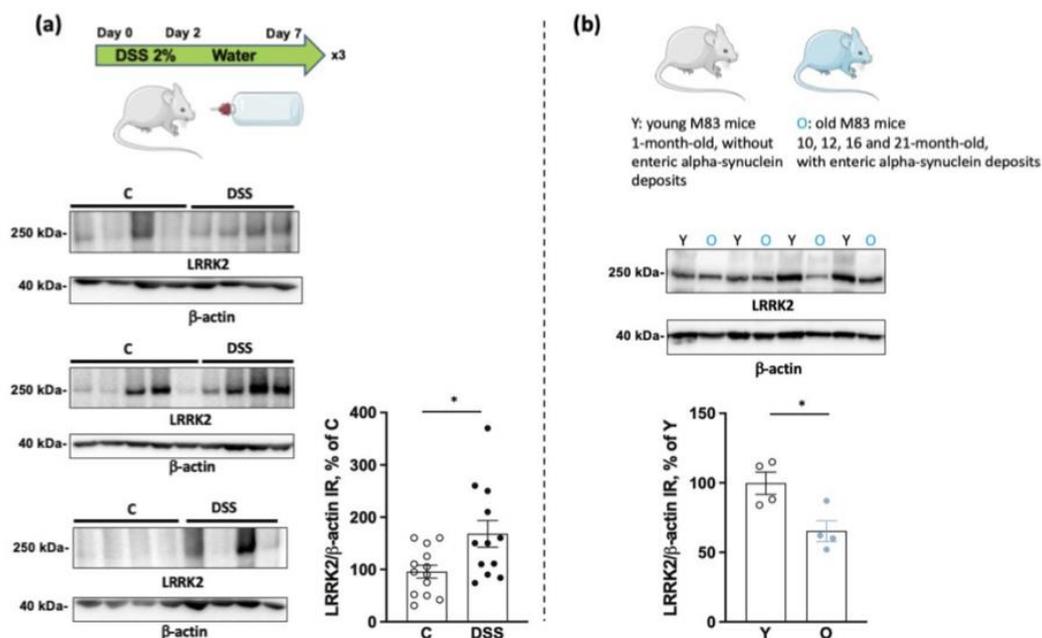
(a) Western blot analysis shows that LRRK2 protein expression is increased in CD sigmoid colon biopsies relative to controls. Data correspond to mean \pm SEM, n=7 for CD and controls (supplementary table 2); (**p<0.01). **(b)** LRRK2 mRNA is increased in CD sigmoid colon biopsies when compared to controls. Data correspond to mean \pm SEM, n=13 and 14 for controls and CD, respectively (supplementary table 2); (*p<0.05). **(c)** Rab10 phosphorylation is not different between sigmoid colon biopsies from CD and controls the expression levels of LRRK2 protein (IR, % of controls) are not different between PASH+ and PASH- subjects (24 \pm 11 vs 40.4 \pm 12, p=0.36), however this might be due to a lack of statistical power due to the small sample size. Data correspond to mean \pm SEM, n=5 for CD and 3 for controls.



Supplementary figure 4. Expression levels of IL-1 β and IFN- γ mRNA in CD gut. Expression levels of LRRK2, IL-1 β and IFN- γ are significantly increased in colon biopsies from CD patients as compared to control subjects. Data correspond to mean \pm SEM, n=13 and 14 for controls and CD, respectively (**p<0.001; ****p<0.0001).



Supplementary figure 5. Expression levels of LRRK2 in the colon of mice with chronic DSS-induced colitis and in mutant human alpha-synuclein transgenic mice. (a) Expression levels of LRRK2 are significantly increased in the colon of mice with chronic DSS-induced colitis. Data correspond to mean \pm SEM, n=13 and 12 for controls and DSS mice, respectively (*p<0.05) **(b)** Expression levels of LRRK2 are significantly decreased in the colon of old M83 mice when compared to young mice (one-month old). Data correspond to mean \pm SEM, n=4 for each group (*p<0.05).



References

1. Bencsik A, Muselli L, Leboindre M, Lakhdar L, Baron T (2014) Early and persistent expression of phosphorylated α -synuclein in the enteric nervous system of A53T mutant human α -synuclein transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:1144–1151. doi: 10.1097/NEN.0000000000000137
2. Dugger BN, Hoffman BR, Scroggins A, Serrano GE, Adler CH, Shill HA, Belden CM, Sabbagh MN, Caviness JN, Driver Dunckley E, Beach TG (2019) Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neurosci Lett* 696:132–139. doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.031
3. Eichele DD, Kharbanda KK (2017) Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol* 23:6016–6029. doi: 10.3748/wjg.v23.i33.6016
4. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous

system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 22:e11-14. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01368.x

5. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen J-M, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche J-P, Damier P, Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE* 5:e12728. doi: 10.1371/journal.pone.0012728
6. Lionnet A, Wade MA, Corbillé A-G, Prigent A, Paillusson S, Tasselli M, Gonzales J, Durieu E, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Duchalais E, Neunlist M, Perkinton MS, Hanger DP, Noble W, Derkinderen P (2018) Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* 6:65. doi: 10.1186/s40478-018-0568-3
7. Parkkinen L, O'Sullivan SS, Kuoppamäki M, Collins C, Kallis C, Holton JL, Williams DR, Revesz T, Lees AJ (2011) Does levodopa accelerate the pathologic process in Parkinson disease brain? *Neurology* 77:1420–1426. doi: 10.1212/WNL.0b013e318232ab4c
8. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, des Varannes SB, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, Derkinderen P (2012) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 45:305–309. doi: 10.1016/j.nbd.2011.08.014
9. Rolli-Derkinderen M, Leclair-Visonneau L, Bourreille A, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P (2020) Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J Neurol* 267:2207–2213. doi: 10.1007/s00415-019-09321-0

Article 2

LRRK2 expression in normal and pathologic human gut and in rodent enteric neural cell lines

Adrien de Guilhem de Lataillade¹ | Martial Caillaud¹ | Thibault Oullier¹ |
 Philippe Naveilhan¹ | Carolina Pellegrini² | Eduardo Tolosa³ | Michel Neunlist¹ |
 Malvyne Rolli-Derkinderen¹ | Ellen Gelpi^{4,5} | Pascal Derkinderen¹ 

¹Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, The enteric nervous system in gut and brain disorders, Nantes, France

²Unit of Histology and Embryology, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy

³Parkinson disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona (UB), Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED: CB06/05/0018-ISCIII), Barcelona, Spain

⁴Neurological Tissue Bank of the Biobank—Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Division of Neuropathology and Neurochemistry, Department of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Correspondence

Pascal Derkinderen, Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, The enteric nervous system in gut and brain disorders, Inserm U1235 Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France.
 Email: pascal.derkinderen@univ-nantes.fr; derkinderenp@yahoo.fr

Funding information

CECAP; FFGP; INCR; Parkinsoniens de Vendée; Parkinsoniens du Maine et Loire; French national research agency

Abstract

Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) gene, which is the gene most commonly associated with Parkinson's disease (PD), is also a susceptibility gene for Crohn's disease, thereby suggesting that LRRK2 may sit at the crossroads of gastrointestinal inflammation, Parkinson's, and Crohn's disease. LRRK2 protein has been studied intensely in both CNS neurons and in immune cells, but there are only few studies on LRRK2 in the enteric nervous system (ENS). LRRK2 is present in ENS ganglia and the existing studies on LRRK2 expression in colonic biopsies from PD subjects have yielded conflicting results. Herein, we propose to extend these findings by studying in more details LRRK2 expression in the ENS. LRRK2 expression was evaluated in full thickness segments of colon of 16 Lewy body, 12 non-Lewy body disorders cases, and 3 non-neurodegenerative controls and in various enteric neural cell lines. We showed that, in addition to enteric neurons, LRRK2 is constitutively expressed in enteric glial cells in both fetal and adult tissues. LRRK2 immunofluorescence intensity in the myenteric ganglia was not different between Lewy body and non-Lewy body disorders. Additionally, we identified the cAMP pathway as a key signaling pathway involved in the regulation of LRRK2 expression and phosphorylation in the enteric glial cells. Our study is the first detailed characterization of LRRK2 in the ENS and the first to show that enteric glial cells express LRRK2. Our findings provide a basis to unravel the functions of LRRK2 in the ENS and to further investigate the pathological changes in enteric synucleinopathies.

KEYWORDS

cyclic AMP, enteric glial cell, enteric nervous system, enteric neuron, LRRK2, Parkinson's disease

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CNS, central nervous system; cAMP, cyclic AMP; DIV, days in vitro; EGC, enteric glial cells; ENS, enteric nervous system; EPAC, exchange protein directly activated by cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinases; FSK, forskolin; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GI, gastrointestinal; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; LB, Lewy body; LMMP, longitudinal muscle and myenteric plexus; LRRK2, leucine-rich repeat kinase 2; PBS, phosphate-buffered saline; PGP 9.5, protein gene product 9.5; PKA, protein kinase A; PSP, progressive supranuclear palsy; SMA, smooth muscle actin; VIP, vasoactive intestinal peptide.

Ellen Gelpi and Pascal Derkinderen contributed equally to this work.

1 | INTRODUCTION

Mutations in the *LRRK2* gene, which encodes leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), are a cause of autosomal dominant Parkinson's disease (PD) (Paisán-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004), and the gene has emerged as one of the most frequently associated with familial and apparently sporadic form of the disease (Gilks et al., 2005). LRRK2 encodes a 286-kDa multi-domain Ser/Thr kinase of 2527 amino acids (Mata et al., 2006), which is ubiquitously expressed, but highly abundant in the kidney, lungs, pancreas, brain (Westerlund et al., 2008), and various peripheral immune cells (Hakimi et al., 2011). The physiological cellular function of LRRK2 is not fully understood but it has been associated with a set of cellular functions including synaptic vesicle recycling (Arranz et al., 2015), control of neurites morphology (Sepulveda et al., 2013), regulation of inflammation, and autophagy/lysosomal functions (Gardet et al., 2010; Gómez-Suaga et al., 2012). LRRK2 is a phosphoprotein with more than 74 potential phosphorylation sites, which is regulated either by autophosphorylation or upstream kinases (reviewed in [Marchand et al., 2020]). Among these phosphorylation sites, Ser910 and Ser935 have received increased attention over the recent years as it has been shown that they mediate the phosphorylation-dependent interaction of LRRK2 with 14-3-3 family proteins and regulate its subcellular localization (Dzamko et al., 2010).

An accumulating body of evidence has emerged in the past 20 years to suggest that PD is both a movement disorder and a digestive disease (reviewed in (Chapelet et al., 2019)). The majority of subjects with PD will eventually develop gastrointestinal (GI) symptoms (Edwards et al., 1992), and autopsy studies consistently showed that Lewy body (LB) pathology is found in the GI tract in nearly every case (Beach et al., 2010; Gelpi et al., 2014). Data from genetic studies further support the close relationship between PD and the gut as the *LRRK2* gene has been identified by genome-wide association studies as a major susceptibility gene for Crohn's disease (Hui et al., 2018). These observations, which suggest that LRRK2 may sit at the crossroads of GI inflammation, PD, and Crohn's disease, raise questions about the expression pattern of LRRK2 in the gut under normal and pathological conditions. In a seminal paper on the topic, Gardet et al. used intestinal biopsy specimens from CD patients in both inflamed and non-inflamed area to show that LRRK2 was expressed in various immune cells from the lamina propria, including macrophages, dendritic cells, and B lymphocytes. Since this publication, others and we have shown that the distribution of LRRK2 in the GI tract was nevertheless not limited to the immune cells (Gardet et al., 2010) but also extended to the two main ganglia of the enteric nervous system (ENS), namely the myenteric and submucosal ganglia (Guilhem de Lataillade et al., 2021; Maekawa et al., 2017). Using colonic biopsies, which can capture the submucosal but not the myenteric ganglia, we also showed that both LRRK2 expression and kinase activity were reduced in PD patients when compared with controls (Guilhem de Lataillade et al., 2021). In the current study, we set out to extend and refine these findings by (i) studying the expression levels of LRRK2 in the myenteric plexus of subjects with LB disorders (ii) determining if, besides enteric neurons, LRRK2 is also expressed by enteric glial cells (EGC) in human adult

ENS and rodent enteric neural cell lines (iii) studying the regulation of LRRK2 expression and phosphorylation in enteric neural cell lines.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Human samples

Specimens of human colon (transverse and descending) obtained from the Neurological Tissue Bank of the Biobank-Hospital Clinic-IDIBAPS have been described previously (Gelpi et al., 2014). Clinicopathological diagnoses comprised Lewy body (LB) disorders (including PD and dementia with Lewy bodies, DLB) in 16 cases and 12 cases of non-LB disorders (Alzheimer's disease, AD pathology, $n = 8$ and progressive supranuclear palsy, PSP pathology $n = 1$, others $n = 3$) (Table 1). All pathologically confirmed LB disorders had ENS involvement with alpha-synuclein aggregates while all non-LB disorders were devoid of ENS alpha-synuclein pathology (Table 1). The non-LB cases served as controls as no changes in the ENS have been reported in AD and PSP either regarding neuronal density (Shankle et al., 1993) or abnormal protein deposits (Dugger et al., 2019; Lionnet et al., 2018; Shankle et al., 1993).

Samples from three non-neurodegenerative controls were used for additional immunohistochemistry experiments. Formalin-fixed paraffin embedded full thickness segments of colon containing the myenteric plexus were obtained from three controls subjects who underwent colonic resection for nonobstructive colorectal carcinoma (83-year-old female), rectal prolapse (93-year-old female), and colostomy repair (75-year-old male). Sampling was performed in macroscopically normal segments of uninvolved resection margins.

This exploratory study was not pre-registered. We also did not conduct sample calculation. The sample size was based on previous similar studies that examined the expression levels of neuronal and/or glial proteins in the human myenteric plexus (Barrenschee, Wedel, et al., 2017; Prigent et al., 2020; Prigent, Lionnet, et al., 2019). Post-hoc power analysis (G*Power 3.1, Düsseldorf University) indicated a power of 0.74 and 0.75 for experiments performed with samples of the transverse and descending colon, respectively. The study was not pre-registered. For LB and non-LB samples, the study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Clinic de Barcelona (registry number 2007/3906 and 2013/8201) and written informed consent was obtained from donors and/or next of kin for obtaining postmortem brain and body tissue samples for diagnostic and research purposes. For non-neurodegenerative controls, sampling and procedures were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the no. DC-2008-402.

2.2 | Cell cultures

Four different cell culture models were used in the current study: one model of primary culture of rat ENS, two cell culture models of enteric glial cells (EGC), and one model of primary culture of rat enteric neurons (Figure 1). Primary culture of rat ENS (termed ENS culture)

TABLE 1 Demographic and samples data for LB (PD and DLB) and non-LB (AD, PSP and other) cases.

Subject #	Diagnosis	Age	Sex	DD (years)	PM delay (min)	ASH (ENS)
160	AD	80	M	10	930	-
161	AD	89	F	14	255	-
166	AD	84	F	10	360	-
169	other	62	M	19	960	-
173	AD	88	M	11	1095	-
176	AD	92	F	11	1281	-
178	AD	93	F	8	360	-
179	AD	83	F	5	360	-
189	other	84	F	13	360	-
199	PSP	78	M	5	360	-
200	other	89	F	4	985	-
247	AD	80	F	1	480	-
157	PD	84	F	24	270	+
158	DLB	79	M	4	600	+
159	DLB	77	F	8	680	+
167	PD	81	F	6	1260	+
168	PD	79	F	6	570	+
180	PD	86	F	1	870	+
181	PD	81	F	12	390	+
182	PD	68	M	6	560	+
187	PD	84	F	12	300	+
192	DLB	77	F	4	860	+
210	PD	85	M	9	735	+
224	PD	82	M	10	435	+
238	PD	76	M	25	1030	+
244	PD	86	F	4	1080	+
245	PD	82	F	30	790	+
246	PD	69	F	22	300	+

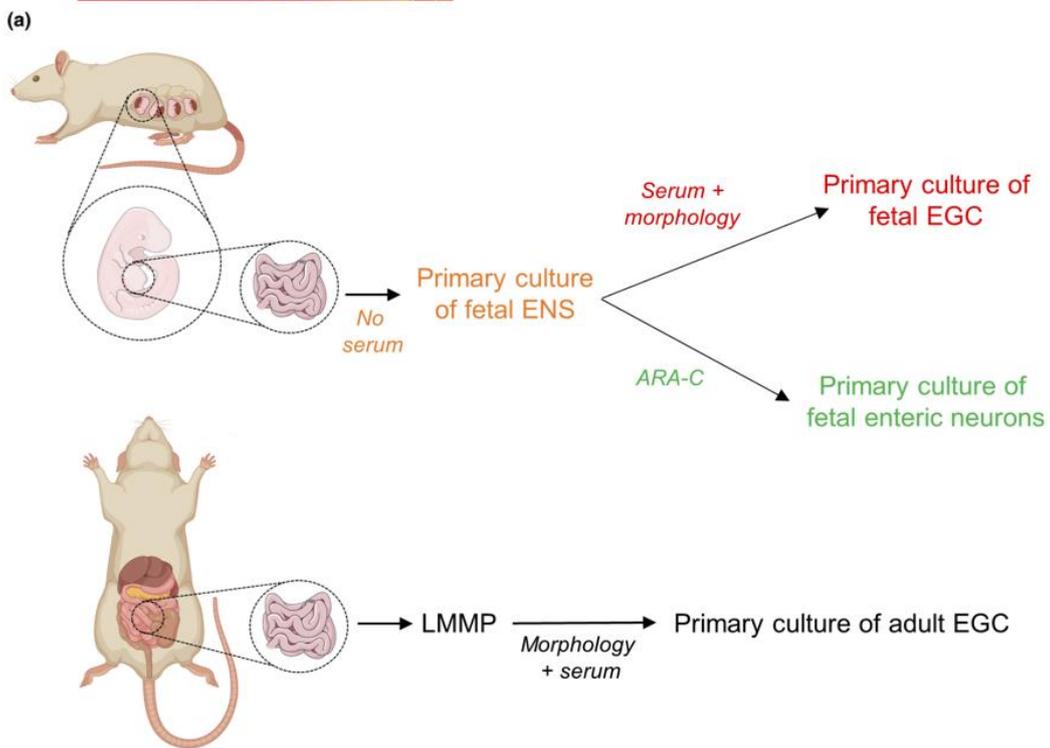
Note: Clinical features of the study population are given in [Table 1](#). There was no significant difference between the two groups with respect to age at death (values are normally distributed, $t = 1.445$, $p = 0.16$), post-mortem sampling delay (values are not normally distributed, $U = 90$, $p = 0.79$), and sex ratio ($p > 0.99$).

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ASH, alpha-synuclein histopathology in the ENS; DD, disease duration, time between diagnosis and autopsy (years); DLB, dementia with Lewy bodies; Other, vascular dementia or mixed pathologies (AD and vascular dementia); PM delay, *postmortem* delay; PSP, progressive supranuclear palsy.

obtained from E15 embryos is routinely performed in our laboratory and has been extensively described and characterized (Chevalier et al., 2008; Lionnet et al., 2018; Paillusson et al., 2010; Prigent, Gonzales, et al., 2019). Rat EGC cell line (termed EGC culture) was obtained from primary culture of rat fetal ENS after selection of cells, trypsinization, and seeding in serum-containing medium as described previously (Cossais et al., 2016; Van Landeghem et al., 2011). Primary culture of rat adult male EGC (termed adult EGC culture) was obtained by dissecting and dissociating longitudinal muscle and myenteric plexus preparations (LMMP) of rat as described previously (Soret et al., 2013). In some experiments, 1% Ara-C (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France, Cat# C1768) was added to the medium of primary

cultures of rat fetal ENS to reduce glial cell proliferation and favor neural cell enrichment (Enteric neurons culture) (Bannerman et al., 1988; D'Errico et al., 2018). [Figure 1](#) recapitulates the characteristics of the four different cell cultures used in the current research and the detailed protocols are listed in supplementary material [S1](#).

All housing and experimental procedures for male rats and pregnant rats were carried out in compliance with the local ethical review panel of INSERM (agreement E. 44011; INSERM, Nantes, France) and in accordance with the Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Animals were housed in standard 42×26×15 cm plastic cages. Bedding consisted of kiln-dried aspen



(b)

	Origin	Short name	Composition
Primary culture of fetal ENS	Embryonic intestine E15	ENS culture	6-10% neurons 20-30% EGC > 50% SMC
Primary culture of fetal enteric neurons	Embryonic intestine E15	Enteric neurons culture	80% neurons
Primary culture of fetal EGC	Embryonic intestine E15	EGC culture	96% EGC
Primary culture of adult EGC	Adult LMMP	Adult EGC culture	82-90% EGC

FIGURE 1 Cell culture models used in the study (a) Schematic representation of the different cell culture models. Primary culture of fetal EGC and primary culture of fetal enteric neurons were derived from primary culture of fetal ENS that were obtained from rat embryonic intestine; for primary culture of adult EGC, the small intestine of adult rat was microdissected to isolate longitudinal muscle-myenteric plexus (LMMP) preparations. Ganglia were then pipetted and mechanically/enzymatically dissociated before plating (b) The main characteristics of the four cell lines are summarized. For the sake of clarity, short names and color code will be used in the manuscript. Parts of the figure were drawn by using pictures from Biorender and Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

shavings (SAFE, Augy, France). Water and food were available (SAFE) ad libitum. Animals were housed at 19–22°C, humidity 55%, and 12:12 h light: dark cycle with lights on at 07:30. All experiments were carried out in accordance with the local Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Sprague–Dawley rats (Janvier Laboratories S.A, Le Genest-St-Isle, France) were housed under standard conditions. Animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation.

Forskolin (FSK), 8-Bromo-cyclic adenosine monophosphate (8-Br-cAMP), and IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) used for

treating the cells were all from Bio-Techne (Noyal, France, Cat# 1099, 1140 and 2845, respectively).

2.3 | Immunofluorescence

Slides from paraffin-embedded human samples were deparaffinized with two xylene baths (10 min each) then incubated in four ethanol baths (100% for 5 min, 95% for 4 min, 70% for 3 min, and 50%

for 2 min). After two rinses in distilled water, slides were washed in phosphate-buffered saline (PBS, Sigma Cat#P7059) and antigen retrieval was performed using either an acidic (2.94 g Sodium Citrate Tribase [Sigma, Cat# S4641]; 1 L distilled water; 500 μ L Tween 20 [Sigma, Cat# P1379]; pH 6) or a basic solution (Trizma base 10mM [Sigma, Cat# T1503]; EDTA 1mM [Sigma, Cat# ED2P]; pH 9) at 95°C for 20 min. Slides were incubated in 100mM NaH₄Cl (Sigma, Cat# A9434) for 15 min before incubation in PBS containing 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma, Cat# 94443) and 10% (v/v) horse serum (Sigma, Cat# H1270) for 1 h. Primary antibodies (Table 2) were incubated overnight at 4°C followed by incubation with secondary antibodies at 21°C for 1 h. Images were acquired with either an AXIO Zoom.V16 fluorescence microscope (Zeiss) coupled to a digital camera (AxioCam HRm, Zeiss) or a confocal microscope Nikon A1 RSi (Nikon SAS). The Lucy–Richardson deconvolution algorithm was used for 3D image enhancement. For quantification, analyses were performed with the ImageJ software 1.8.0 (NIH) from images of the AXIO Zoom microscope. Each submucosal or myenteric ganglion was marked, fluorescence signal was recorded from 4 to 7 submucosal/myenteric ganglia for each slide and the mean gray value (integrated density/ μ m² ganglionic tissue) was then determined for each case in the transverse and/or descending colon. Two slides per subject were analyzed for the transverse colon. Analysis of fluorescence was performed by ADGDL who was blinded to the clinical and neuropathological status of the subjects.

For cell culture models, all cell models were first fixed in PBS (Sigma, Cat# P5119) with 4% (v/v) paraformaldehyde (Sigma, Cat# 158127) at 21°C for 30 min. ENS culture was pre-incubated in PBS containing 10% (v/v) of bovine serum albumin (BSA, Sigma, Cat# A7030) and 0.25% (v/v) Triton X-100 (Sigma, Cat# X100) for 5 min, and then in PBS with 10% (v/v) BSA for 30 min, before overnight incubation at

4°C with primary antibodies in PBS with 3% (v/v) BSA (Table 2). EGC cultures and enteric neurons culture were pre-incubated in PBS containing 0.5% (v/v) Triton X-100 and 10% horse serum for 1 h before overnight incubation with primary antibodies at 4°C in the same solution (Table 2). Secondary antibodies were then incubated at 21°C for 1 h. Images were acquired with either an AXIO Zoom. V16 fluorescence microscope (Zeiss) coupled to a digital camera (AxioCam HRm, Zeiss) or a confocal microscope Nikon A1 RSi (Nikon SAS).

2.4 | Western blot

Cells were harvested and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA, Merck Millipore, Cat# 20-188) with 2mM orthovanadate (Sigma, Cat# S6505), phosphatase inhibitors cocktail III (Sigma, Cat# P5726), and a protease inhibitors cocktail (Sigma, Cat# 11697498001). Samples were sonicated, adjusted volumes of Sample Reducing Agent (Life Technologies, Cat# NP0009) and NuPAGE Sample Buffer (Life Technologies, Cat# NP0008) were added before heating at 98°C for 5 min. Equal amount of lysates were separated using either the NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Life Technologies, Cat# NP0336BOX) or NuPAGE 3–8% Tris-Acetate gels (Cat# EA0375PK2), together with the 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate running buffer (Life Technologies, Cat# IB23002), or the Tris-Acetate SDS running buffer, respectively, before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes (25 V, 9 min) with the iBlot™ Dry Blotting System (Life Technologies, Cat# IB21001). Membranes were then blocked for 1 h at 21°C in Tris-buffered saline (Sigma, Cat# T5912) with 0.1% (v/v) Tween-20 (Sigma, Cat# P1379) and 5% (w/v) non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (Table 2). Bound antibodies were detected with horseradish

TABLE 2 Primary antibodies

Reference	Target	Details	Application(s) (dilution)	Source
MJFF2 (c41-2)	LRRK2	rm	IF (1:250), WB (1:1000)	Abcam
EB06550	LRRK2	gp	IF (1:100–1:250)	Everest Biotech
MA1-83428	PGP 9.5	mm	IF (1:500), WB (1:1000)	Thermo Fisher
A-21271	HuC/HuD	mm	IF (1:250–1:500)	Thermo Fisher
CIPO	Hu	hp	IF (1:500)	CIPO patient serum
Z0311	S100 β	rp	IF (1:3000)	Dako
287006	S100 β	cp	IF (1: 2000)	Synaptic systems
ab7817	α SMA	mm	IF (1: 1000)	Abcam
UDD2	pS935 LRRK2	rm	WB (1:1000)	Abcam
MJF-R21(ab230261)	pT73 Rab10	rm	WB (1:1000)	Abcam
MJF-R23 (ab237703)	Rab10	rm	WB (1:1000)	Abcam
A5441	β -actin	mm	WB (1:10000)	Sigma
ab5694	α SMA	rp	WB (1:1000)	Abcam
IF03L (GA5)	GFAP	mm	WB (1:1000)	Calbiochem
T8660	β III-tubulin	mm	WB (1:1000)	Sigma

Abbreviations: CIPO, chronic intestinal pseudo-obstruction; cp, chicken polyclonal; gp, goat polyclonal; hp, human polyclonal; mm, mouse monoclonal; rm, rabbit monoclonal; rp, rabbit polyclonal.

peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:5000; Life technologies, Cat# 31460) or anti-mouse (1:5000; Sigma, Cat# A9044) antibodies and visualized by enhanced chemiluminescent detection using either Clarity™ Western ECL (Biorad, Marnes-la-Coquette, France, Cat# 1705060) or Supersignal™ West Femto (ThermoFisher Scientific, Cat# 34094) substrates. For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with Image Lab software (Biorad) and image J software (NIH; version 1.51). To allow comparison between different films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls. LRRK2 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of β -actin, and expressed as percentage of controls; pT73 rab10 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of rab10, and expressed as percentage of controls; pS935 LRRK2 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of LRRK2, and expressed as percentage of controls.

2.5 | Quantitative PCR analysis

RNA extraction from ENS culture was performed with NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Cat# 740966) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Saint-Herblain, France). One microgram purified mRNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Cat # 18080044). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche Molecular Biochemicals, Cat# AB4166B) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies, Cat# 4376600). The following primers were used: *LRRK2*, forward: 5'GCTCTGAACAGGTTTCATTGGGA3'; reverse: 5' CCAGACACTGAATTTCTTGGTCATC3'. *RPS6*, forward: 5'GCATTGTGGATGCCAACCTG3'; reverse: 5'GTCCTGGGCTTCTTACCTTCT3'.

2.6 | Cell culture viability

Cell viability was assessed using the Celltiter 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium assay (MTS) (Promega, Charbonnières-les Bains, France, Cat#G3582). ENS culture was cultured in 96-well plates and treated with 20 μ M FSK for 72 h. After removal of the medium, CellTiter 96 Aqueous One Solution reagent was added to each well, according to the manufacturer's instructions. Viability of the culture was determined by its ability to metabolize the reagent compared with an untreated culture (measure of absorbance at 490 nm).

2.7 | Statistics

All quantitative data shown are mean \pm standard error of the mean (SEM). For comparison of quantitative data between groups, a

Shapiro–Wilk test was performed in order to determine whether or not data followed a normal distribution; in case of normal distribution, an unpaired t-test or one-way ANOVA followed by either Dunnett's (comparison to control condition only) or Tukey's (comparison between all conditions) multiple comparisons tests were performed for two or multiple groups comparison, respectively; for data that were not normally distributed, Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis then Dunn's multiple comparisons tests were performed for two or multiple groups comparison, respectively. For comparison of qualitative data between groups, Fisher's exact test was performed. All tests were two-tailed. Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$. GraphPad Prism software version 9.1.1 (GraphPad Software Inc.) was used for statistical analyses and for designing figures. No sample calculation was performed and no exclusion criteria were pre-determined. No test for outliers was conducted.

3 | RESULTS

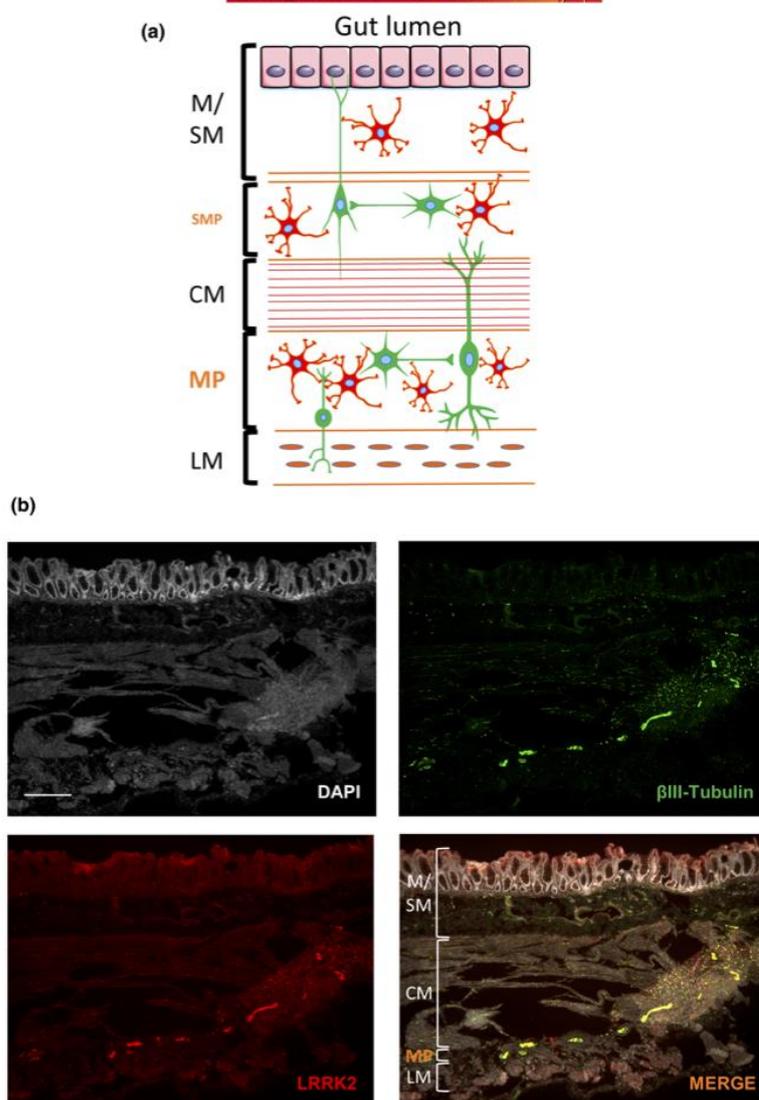
3.1 | No changes in the expression levels of LRRK2 in the myenteric plexus of subjects with LB disorders

LRRK2 distribution by immunofluorescence in cross-section of the colon from control cases (subjects with non-neurodegenerative disorders) was consistent with that of previous reports with strong staining of the myenteric plexus (Figure 2a,b). In order to analyze LRRK2 expression levels in the myenteric plexus in the context of enteric synucleinopathy, transverse and descending colonic samples from LB cases (Table 1) were stained with two anti-LRRK2 antibodies (Table 2) and compared with non-LB cases. Myenteric ganglia were delineated after immunostaining with either the neuronal marker PGP 9.5 or the glial marker S100 β (Scheuermann et al., 1989) (Figure 3a). No difference in LRRK2 immunofluorescence intensity was observed between the two groups when samples from the transverse and descending colon were analyzed regardless of the antibody used (Figure 3a,b). Additional findings showed that LRRK2 immunofluorescence intensity in the submucosal plexus of the descending colon was also comparable between LB disorders and non-LB disorders cases (Figure S1).

3.2 | LRRK2 is expressed in both neurons and glia in the human myenteric plexus

ENS ganglia are primarily composed of neurons and glial cells. Confocal immunofluorescence microscopy experiments of myenteric ganglia from control cases (subjects with non-neurodegenerative disorders) revealed that LRRK2 immunoreactive cells were observed over the entire thickness of the ganglia and expressed in the cytoplasmic perinuclear region of both neurons and EGC (Figure 4a,b). Some nerve fibers were also immunoreactive for LRRK2 (Figure 4a,b).

FIGURE 2 Distribution of LRRK2 in human intestinal tissue (a) Schematic cross-sectional view of the human colon highlighting the ENS and the distribution of enteric neurons (green) and glial cells (red). M/SM: mucosa/submucosa; SMP: submucosal plexus; CM: circular muscle; MP: myenteric plexus; LM: longitudinal muscle. (b) Paraffine-embedded colonic tissues from three non-neurodegenerative controls were immunolabeled with mouse anti- β III-Tubulin (green) and goat anti-LRRK2 (red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Representative photomicrographs are shown. Scale bar is 100 μ m. Parts of the figure were drawn by using the Motifolio Neuroscience toolkit.



3.3 | LRRK2 is expressed in both neurons and glia in ENS culture

The brain is not the only source from which neurons can be cultured and there are now established protocols for the isolation of enteric neurons from rodents and especially rats (Chevalier et al., 2008; Eaker & Sallustio, 1994). These have already been shown to be useful for studying the expression of neuronal proteins involved in neurodegeneration such as alpha-synuclein and tau (Lionnet et al., 2018; Prigent et al., 2019). We therefore characterized the expression pattern of LRRK2 in ENS culture in order to further study the regulation of LRRK2 expression and phosphorylation in the ENS. After 14 DIV, the culture is considered mature and contains Hu-immunoreactive neurons and S100 β -immunoreactive glia organized in interconnected ganglia, laying on a smooth muscle cells (α SMA positive) monolayer (Chevalier

et al., 2008; Prigent, Gonzales, et al., 2019). Immunofluorescence experiments showed that LRRK2 was expressed in both enteric neurons and EGC in ENS culture (Figure 5). In contrast, LRRK2 was not present in smooth muscle cells (Figure S2).

3.4 | LRRK2 expression in ENS culture is decreased following sustained activation of the cAMP pathway

The cAMP signaling pathway is a pivotal regulator of gene expression not only in the brain (Montminy, 1997) but also in the ENS (Chevalier et al., 2008; Paillusson et al., 2010). We therefore set out to study the effects of cAMP on the expression levels of LRRK2 in the ENS. To this end, ENS culture was treated with the adenylate cyclase activator forskolin (FSK) at 20 μ M for various time points (3–72 h). FSK treatment induced a progressive and significant decrease in LRRK2 protein levels

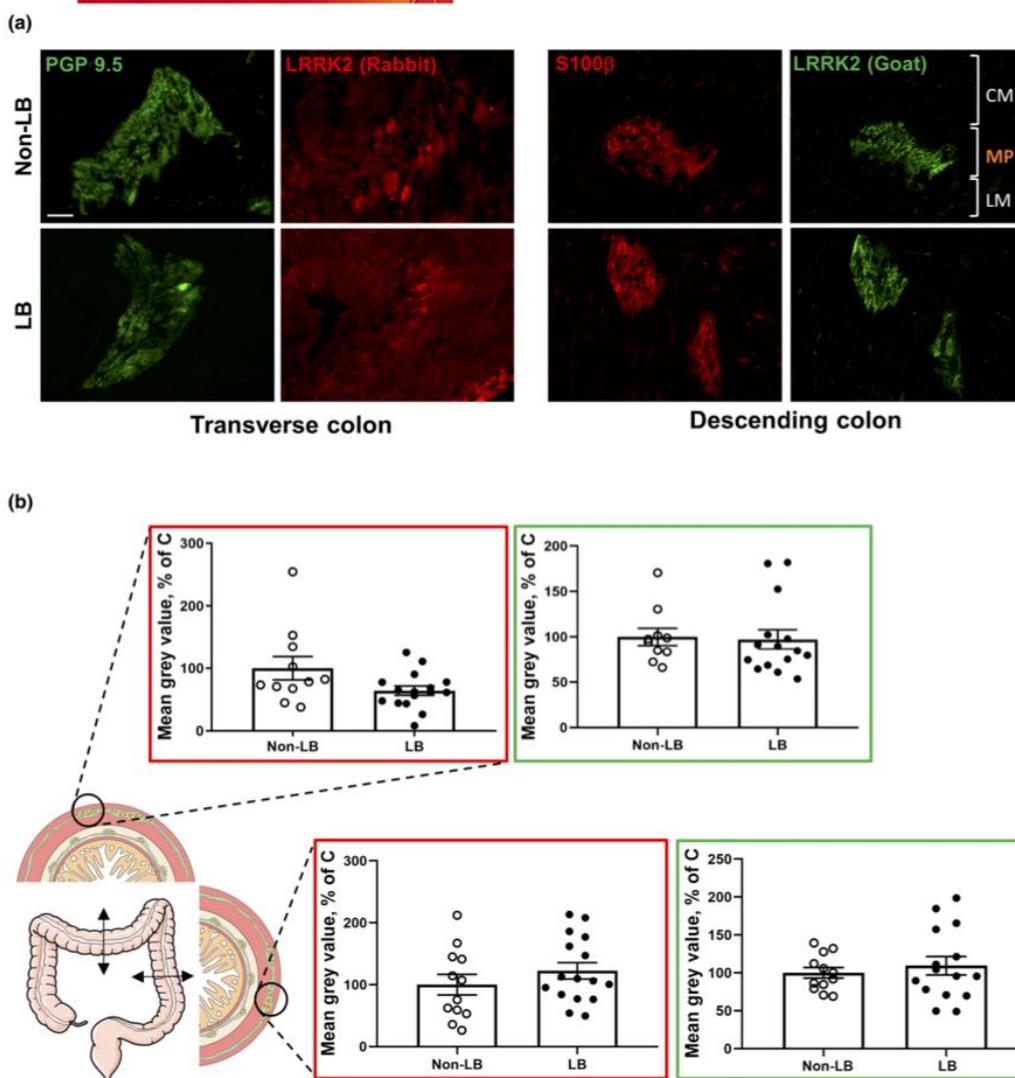


FIGURE 3 Expression pattern and level of LRRK2 in the myenteric plexus of LB and non-LB disorders cases. (a) LRRK2 antibodies (goat anti-LRRK2 in green and rabbit anti-LRRK2 in red) were used to detect LRRK2 in the myenteric ganglia in colon from LB and non-LB disorders cases. Myenteric ganglia were delineated either with rabbit anti-S100β (red) or anti-PGP 9.5 (green). Representative photomicrographs of LB and non-LB cases are shown (left panel, transverse colon, #168 and #179, respectively; right panel, descending colon #210 and #247, respectively). Scale bar is 50 μm. CM: circular muscle; MP: myenteric plexus; LM: longitudinal muscle. (b) Quantitative analysis of LRRK2 immunofluorescence in the myenteric plexus (8–14 ganglia per subject) of the transverse or descending colon from LB and non-LB cases. Graphics outlined in red correspond to experiments performed with rabbit anti-LRRK2 antibody while those outlined in green correspond to goat anti-LRRK2 antibody experiments. Data are shown as corrected mean gray value normalized to controls and presented as mean ± SEM. For transverse colon, $n = 16$ for LB and 11 for non-LB cases, when rabbit anti-LRRK2 was used and $n = 15$ for LB and 10 for non-LB cases, when goat anti-LRRK2 was used as no samples were available for subject #199 and subjects #166, #187, and #199, respectively (Table 1); for descending colon, $n = 16$ for LB and 12 for non-LB cases; n indicates the number of subjects. As data for transverse colon were not normally distributed, a Mann–Whitney test was performed (LB vs. non-LB, $p = 0.77$ with $U = 52$ and 0.59 with $U = 65$ for rabbit and goat anti-LRRK2, respectively). As data for descending colon were normally distributed, unpaired t-test was performed (LB vs. non-LB, $p = 0.31$ with $t = 1.023$ and 0.50 with $t = 0.681$ for rabbit and goat anti-LRRK2, respectively). Parts of the figure were drawn by using pictures Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

(50% decrease at 72h; Figure 6a). Both cell morphology (Figure 6b) and MTS assay (Figure 6c) showed that LRRK2 down-regulation induced by FSK occurred in the absence of any changes in cell viability.

A similar decrease in LRRK2 expression was observed when cells were treated the non hydrolyzable cAMP analog 8-Br-cAMP together with the phosphodiesterase inhibitor IBMX (100 μM each for

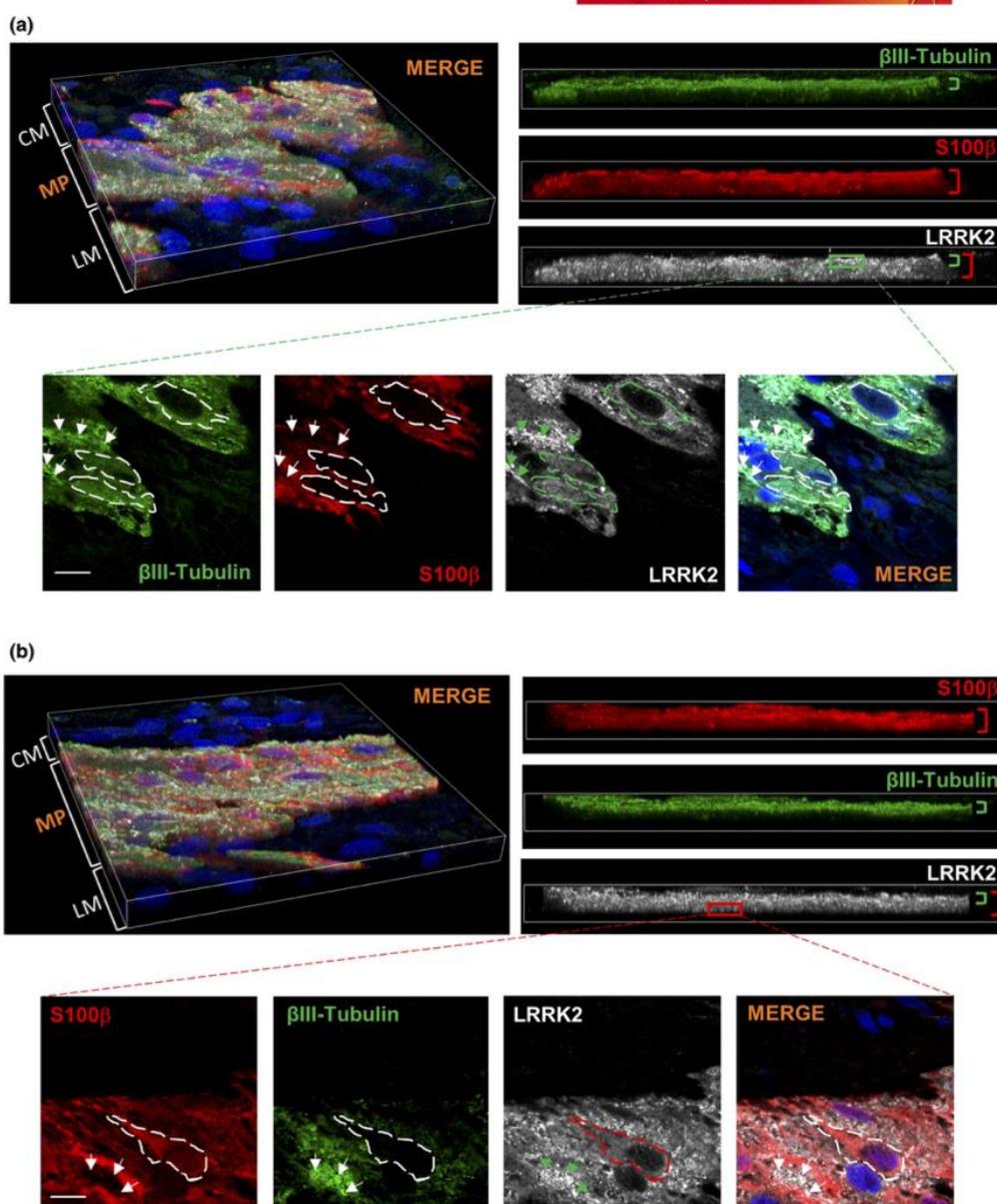


FIGURE 4 Distribution and localization of LRRK2 in the human adult myenteric plexus (a) Paraffin-embedded colonic tissues from 3 non-neurodegenerative controls were immunolabeled with mouse anti- β III-Tubulin (green), rabbit anti-S100 β (red) and goat anti-LRRK2 (white) antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Representative 3D confocal micrograph of a myenteric ganglion is shown. 3D acquisition volume: $x = y = 100\mu\text{m}$, $z = 8\mu\text{m}$. Higher magnification of the ganglion showing LRRK2 expression in the neuronal perinuclear cytoplasm (dashed lines) and in nerve fibers (arrows). Scale bar is $10\mu\text{m}$, (b) samples were processed as in (a) and representative 3D confocal micrograph of another myenteric ganglion is shown. Higher magnification showing LRRK2 expression in the glial perinuclear cytoplasm (dashed lines) and in nerve fibers (arrows). Scale bar is $10\mu\text{m}$.

24 and 72 h) (Figure 6d), thereby demonstrating that cAMP is directly responsible for LRRK2 downregulation. The effects of FSK on LRRK2 protein were also observed at the mRNA levels with a significant decrease in *Lrrk2* mRNA starting as early as 3 h after treatment and persisting at 72 h (Figure 6e). Rab10 is a key physiological substrate of

LRRK2 and phosphorylation of Rab10 at Thr73 is commonly used to monitor LRRK2 kinase activity (Steger et al., 2016). When cell lysates were analyzed with a Rab10 phospho-specific antibody, the amount of Rab10 phosphorylated at Thr73 was significantly decreased following a 72-h treatment with FSK (Figure 6f).

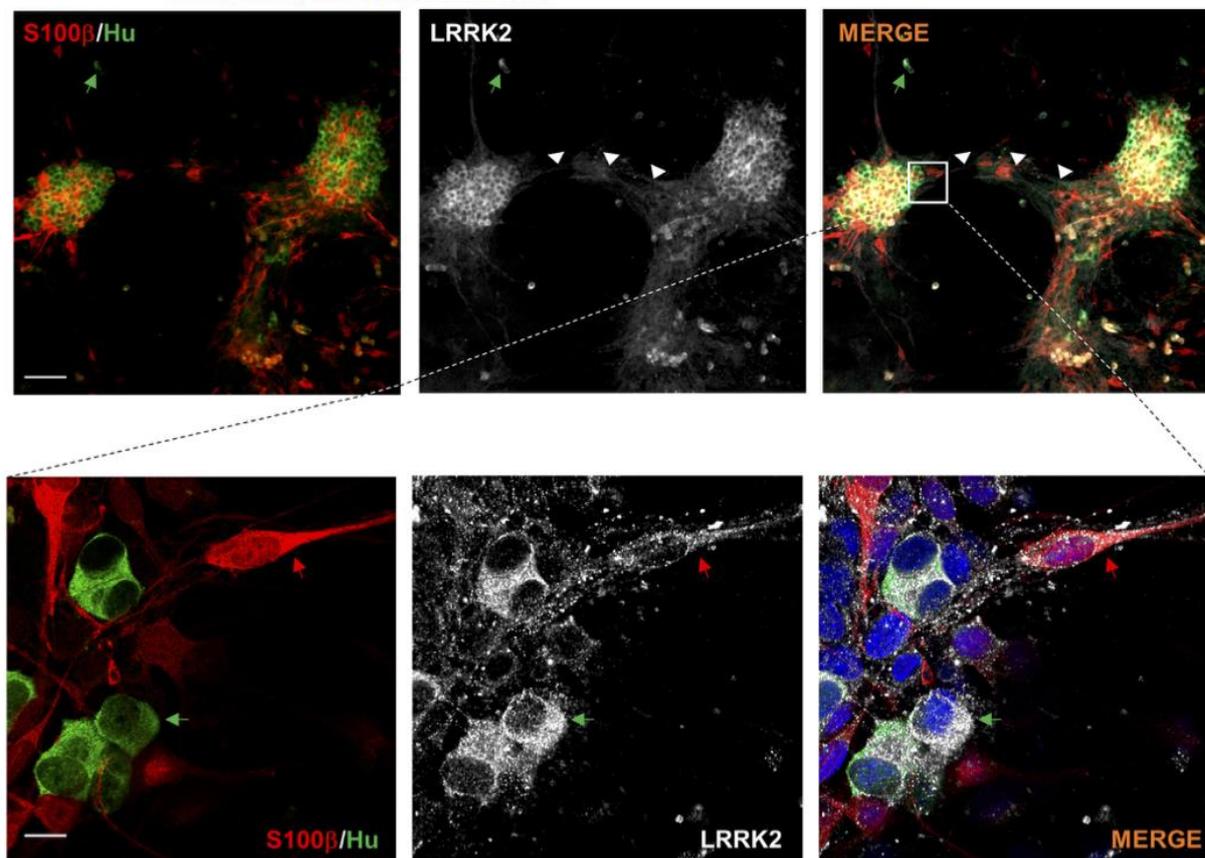


FIGURE 5 Distribution and localization of LRRK2 in ENS culture. ENS culture at 14 DIV was immunolabeled with rabbit anti-S100 β (red), mouse anti-Hu (green), and goat anti-LRRK2 (white) antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Upper panel at low magnification: LRRK2 is present in ganglia, inter-ganglionic fibers (arrowheads) and in the cell body of an isolated neuron (green arrow), scale bar is 50 μ m. Lower panel at high magnification: LRRK2 is expressed by EGC (red arrow) and neurons (green arrow), scale bar is 10 μ m.

3.5 | The regulation of LRRK2 expression by cAMP differs between enteric neurons and EGC cultures

To identify in which cell type LRRK2 expression is regulated, we used purified culture of rat enteric glia or neurons (Figure 1). Immunohistochemistry and Western blot experiments confirmed that EGC culture express the glial markers S100 β and GFAP but not the neuronal markers Hu and PGP 9.5 (Figure 7a,b); the opposite expression pattern was observed for enteric neurons culture (Figure 7a,b). In addition, both cell cultures expressed LRRK2 protein (Figure 7b). An 80% decrease in LRRK2 expression was observed when EGC culture was treated with FSK for 72h (Figure 7c). Conversely, such a treatment induced a five-fold increase in LRRK2 expression levels in enteric neurons culture (Figure 7d). In order to confirm the findings obtained in EGC culture, we performed additional experiments with a more mature model, namely primary culture of adult EGC (Figure 1). These cells behaved similarly to EGC (Figure 7c) and ENS cultures (Figure 6a) in the presence of FSK with a marked and significant 48% decrease in LRRK2 expression levels after 72h of treatment (Figure S3a).

3.6 | LRRK2 phosphorylation is regulated by short-term modulation of cAMP pathway in ENS and EGC cultures

LRRK2 is phosphorylated on several Ser/Thr residues following the activation of the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway either in vitro (Muda et al., 2014) or in transfected cell models (Li et al., 2011). Among these sites, phosphorylation at Ser935, which regulates 14-3-3 binding to LRRK2 and its cellular localization (Dzamko et al., 2010; Li et al., 2011), has been largely studied. To study if phosphorylation on this residue also occurs in our culture models, ENS and EGC cultures were treated with 20 μ M FSK for 10, 30, and 60 minutes and analyzed by Western blot with a phospho-specific antibody. A decrease in LRRK2 phosphorylation at ser935 was detectable as early as 10 min after treatment and persisted at 30 min (Figure 8a). Similar effects were observed when cells were treated with 8-Br-cAMP and IBMX (Figure 8b) and in mature EGC (Figure S3b). The decrease in LRRK2 phosphorylation at ser935 was accompanied by a decrease in LRRK2 kinase activity as evaluated by Rab10 phosphorylation (Figure S4).

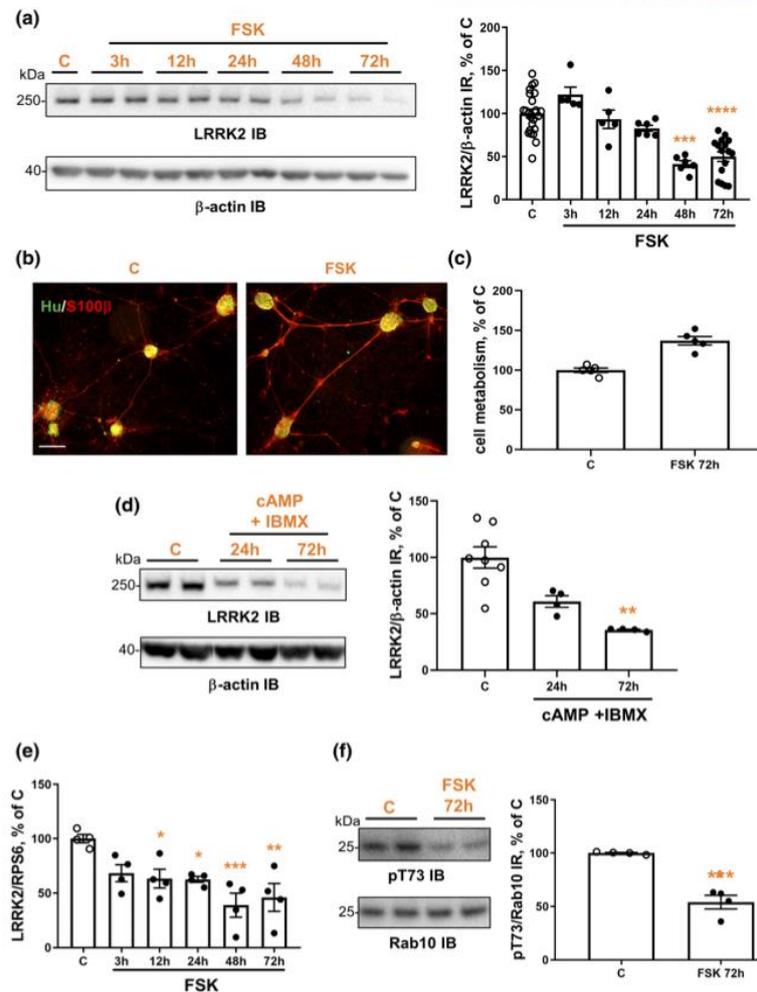


FIGURE 6 Effects of FSK and cAMP on the expression levels of LRRK2 in ENS culture. (a) ENS culture was treated or not (c) with 20 μ M of FSK for 3, 12, 24, 48, or 72 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using rabbit anti-LRRK2 antibody. Membranes were also probed with an anti- β -actin antibody to ensure equal protein loading. Data correspond to mean \pm SEM ($n = 23, 5, 5, 6, 6,$ and 16 for C, 3, 12, 24, 48, and 72 h of FSK, respectively; n indicates the number of wells). As data from 3 h-treated samples were not normally distributed, Kruskal-Wallis ($40.25, p < 0.0001$) then Dunn's multiple comparisons tests were performed (treated vs. control $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$). (b) ENS culture was treated or not (C) with 20 μ M FSK for 72 h and then immunolabeled with human anti-Hu (green) and chicken anti-S100 β (red) antibodies. Scale bar is 250 μ m (c) ENS culture was treated or not (C) with 20 μ M FSK for 72 h and cell metabolism/viability was evaluated by performing an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. Mean 490 nm absorbance is expressed as percentage of controls and data correspond to mean \pm SEM ($n = 5, n$ indicates the number of wells). (d) ENS culture was treated or not (C) with 100 μ M of 8-Br-cAMP and IBMX for 24 or 72 h. Immunoblot analysis was performed as in (a). Data correspond to mean \pm SEM ($n = 8, 4$ and 4 for C, 24 and 72 h of cAMP/IBMX conditions, respectively, n indicates the number of wells). As data for 72 h-treated samples were not normally distributed, Kruskal-Wallis ($11.27, p < 0.001$) then Dunn's multiple comparisons tests were performed (treated vs. control $**p < 0.01$). (e) Quantitative PCR analysis of LRRK2 mRNA in ENS culture treated or not (C) with 20 μ M FSK for 3, 12, 24, 48, or 72 h. Data correspond to mean \pm SEM ($n = 4$ for each condition, n indicates the number of wells). As data were not normally distributed, one-way ANOVA ($F = 6.163, p < 0.01$) then Dunnett's multiple comparisons tests were performed (treated vs. control $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). (f) ENS culture was treated or not (C) with 20 μ M FSK for 72 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with Rab10 and Rab10 phosphorylated at Thr73 (pT73) antibodies. Data correspond to mean \pm SEM ($n = 4, n$ indicates the number of wells). As data were normally distributed, unpaired t-test was performed (treated vs. control $***p < 0.001$ with $t = 7.231$)

4 | DISCUSSION

The present results indicate that LRRK2 protein is constitutively expressed in the two main ENS cell types, namely enteric neurons and

EGC, in both fetal and adult tissues. As far as we know, our study is the first to report that LRRK2 is present in EGC. There is now a large body of evidence to support that EGC are the digestive counterparts of CNS astrocytes. EGC surround both the neuronal cell

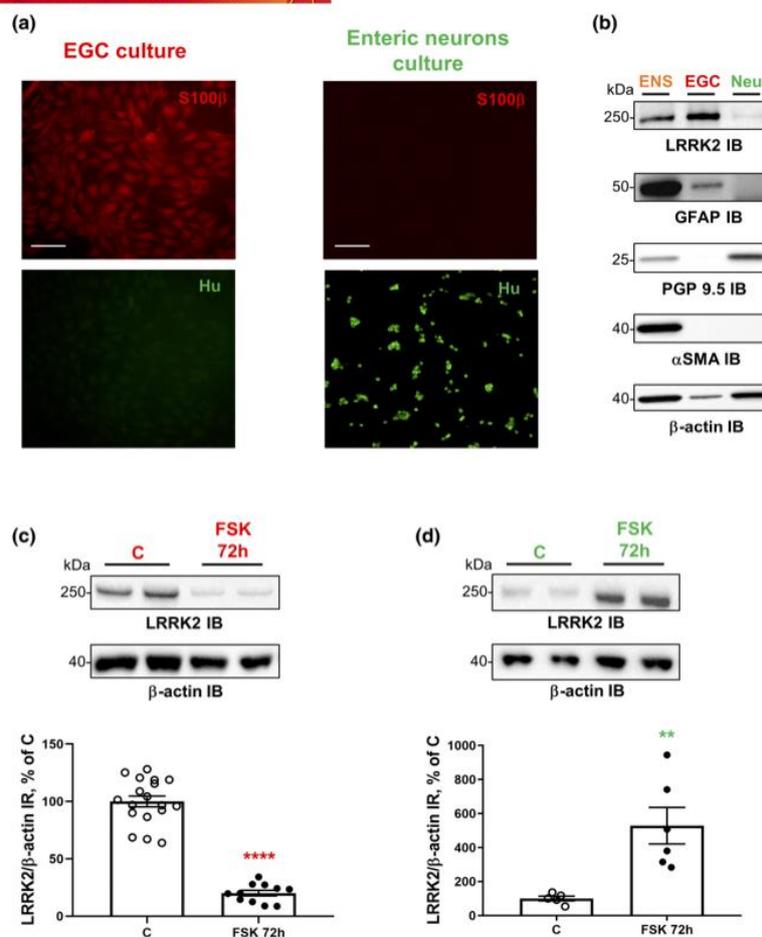


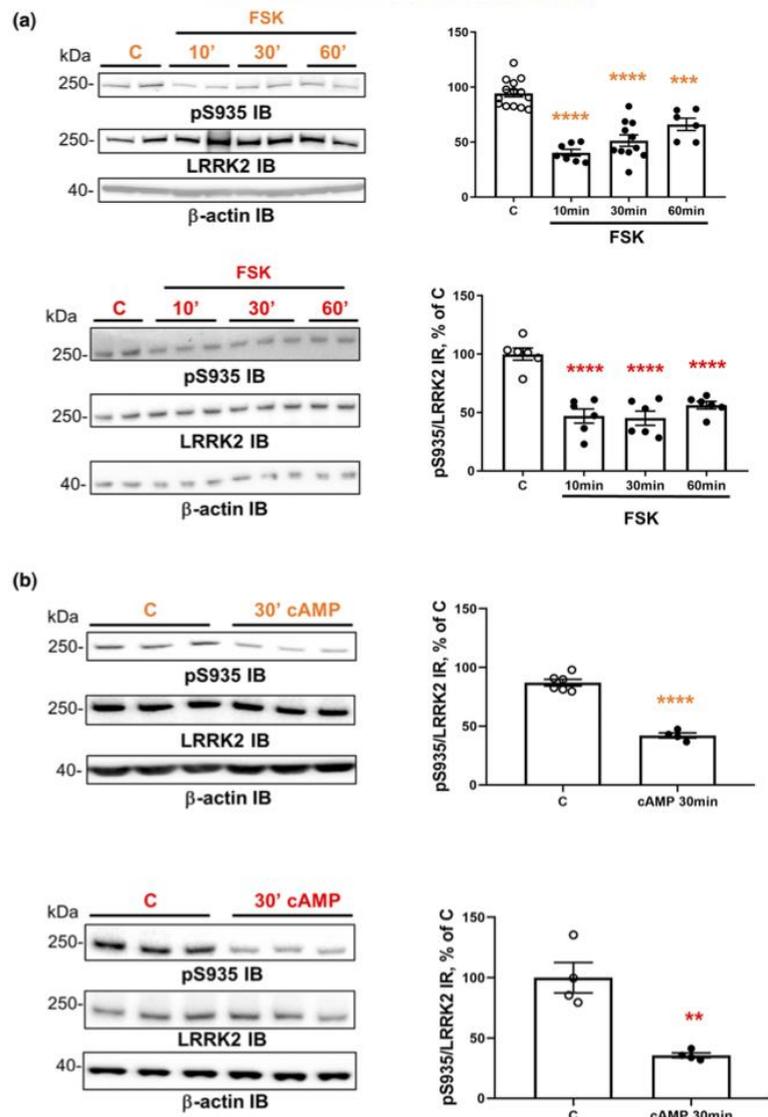
FIGURE 7 Effects of FSK on the expression levels of LRRK2 in EGC culture and in enteric neurons culture (a) EGC and enteric neurons cultures were immunolabeled with chicken anti-S100β (red) and human anti-Hu (green) antibodies. Scale bar is 100 μm. (b) Cell lysates from ENS culture, EGC culture, and enteric neurons culture (Neu) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against LRRK2 (MJFF2), GFAP, PGP 9.5, and αSMA. Membranes were also probed with an anti-β-actin antibody to ensure equal protein loading (c) EGC culture was treated or not (C) with 20 μM FSK for 72h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with LRRK2 (MJFF2) antibodies. Membranes were also probed with an anti-β-actin antibody to ensure equal protein loading. Data correspond to mean ± SEM ($n = 18$ and 11 for C and FSK, respectively, n indicates the number of wells). As data were normally distributed, unpaired t -test was performed (treated vs. control **** $p < 0.0001$ with $t = 12.69$). (d) Enteric neurons culture was treated or not (C) with 20 μM FSK for 72h. Immunoblot analysis was performed as in (c). Data correspond to mean ± SEM ($n = 5$ and 6 for C and FSK, respectively, n indicates the number of wells). As data were normally distributed, an unpaired t -test was performed (treated vs. control ** $p < 0.01$ with $t = 3.593$).

bodies and the axon bundles, an aspect that is highly reminiscent of the close relationship between astrocytes and neurons in the CNS (Jessen & Mirsky, 1983). EGC and astrocytes are also similar at the molecular and functional levels as they share markers (Jessen & Mirsky, 1980) as well as neuroprotective (Abdo et al., 2010) and neuro-immunomodulatory properties (Chow et al., 2021). Our findings are therefore in line with the previous observation that showed the presence of LRRK2 in both adult human brain astrocytes and in various astrocyte cell lines (Miklossy et al., 2006). LRRK2 functions in astrocytes are starting to be uncovered (Filippini et al., 2021) with a possible role in the regulation of CNS inflammation (Munoz et al., 2015) and alpha-synuclein clearance (Streubel-Gallasch et al., 2021). It is therefore tempting to speculate that

EGC-expressed LRRK2 could play similar roles by modulating intestinal alpha-synuclein aggregation and inflammation in the gut, two processes that have been reported in the GI tract of PD subjects (Devos et al., 2013; Fenyi et al., 2019; Schwirtz et al., 2018).

Regarding enteric neurons, our results confirm and extend previous findings, which reported that LRRK2 is expressed in neurons from the submucosal and myenteric plexus of mouse and human colon (Maekawa et al., 2017; de Guilhem de Lataillade et al. 2021). Using LRRK2-KO mice, Maekawa and collaborators elegantly showed that LRRK2 invalidation was associated with changes in mRNA levels coding for the major intestinal neuronal peptides, with a significant increase in vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA together with a significant decrease in the amounts of mRNAs for substance P and

FIGURE 8 Effects of FSK and cAMP on LRRK2 phosphorylation in ENS and EGC cultures (a) ENS and EGC cultures were treated or not (C) with 20 μ M FSK for 10, 30- or 60-min. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies against LRRK2 (MJFF2) and LRRK2 phosphorylated at Ser935 (UDD2). Membranes were also probed with an anti- β -actin antibody to ensure equal protein loading. Data correspond to mean \pm SEM (for ENS culture, $n = 14, 7, 11$ and 6 for C, 10, 30 and 60 min FSK, respectively; for EGC culture, $n = 6$ for each condition, n indicates the number of wells). As data were normally distributed, one-way ANOVA ($F = 32.80$ for ENS culture and 23.91 for EGC culture with $p < 0.0001$ for both) then Dunnett's multiple comparisons tests were performed (treated vs. control $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$) (b) ENS and EGC cultures were treated or not (C) with 100 μ M 8-Br-cAMP and 100 μ M IBMX for 30 min. Immunoblot analysis was performed as in (a) (for ENS culture, $n = 6$ and 4 for C and 8-Br-cAMP/IBMX respectively; for EGC cell line $n = 4$ for each condition, n indicates the number of wells). As data were normally distributed, unpaired t-test was performed (for ENS culture, $t = 11.26$, treated vs. control $****p < 0.0001$; for EGC culture, $t = 5.047$, treated vs. control $**p < 0.01$)



neuropeptide Y. These findings, which suggest that LRRK2 is either capable of regulating the expression levels of neuropeptides in the adult ENS or the neurogenesis of peptidergic neurons, open interesting perspectives on the possible role of enteric LRRK2 (Maekawa et al., 2017). There is indeed solid evidence to suggest that neuronal peptides exert key functions in the gut and are involved in the development of some GI tract disorders, such as inflammatory bowel diseases (reviewed in [Margolis & Gershon, 2009]). Remarkably, while we showed that the amount of LRRK2 was significantly decreased in sigmoid biopsies from PD subjects when compared with controls (de Guilhem de Lataillade et al. 2021), Barrenschee and colleagues reported an upregulation of VIP mRNA in PD rectal biopsy lysates (Barrenschee, Zorenkov, et al., 2017). These findings, together with the data obtained in LRRK2-KO mice and the observation showing that LRRK2 controls the expression of various mRNA (Reinhardt et al., 2013), suggest that there might be a direct link between LRRK2

and VIP expression in enteric neurons. Further study is needed not only to clarify the details of this possible interplay between LRRK2 and VIP regulation but also to determine whether the expression of LRRK2 in enteric neurons is ubiquitous or limited to specific neurochemical subtypes, for example VIPergic neurons. It will be also important to evaluate the possible roles of LRRK2 on principal GI functions such as motility and permeability.

We did not observe any significant difference in LRRK2 protein expression levels between subjects with LB and non-LB disorders, either in the myenteric or in the submucosal plexus. At first glance, these findings may seem at odds with our previous report, in which we showed that LRRK2 expression was reduced in sigmoid GI biopsies from PD subjects when compared with controls. It should be however borne in mind that the samples and the technical approaches that were used in our two studies were radically different; in our first paper, LRRK2 expression was quantified by



Western Blot and qPCR in biopsy lysates while in the current study LRRK2 immunofluorescence signal was analyzed in paraffin slides from cross-section of the colon. Besides a few submucosal/mucosal EGC and neural processes (Corbillé et al., 2016), pinch biopsies capture various LRRK2 immune cells from the lamina propria, which express high levels of LRRK2, such as macrophages, dendritic cells, and B lymphocytes (Gardet et al., 2010). Therefore, the evaluation of LRRK2 amount in biopsy lysates more likely reflects LRRK2 expression in immune rather in neural cells. This might explain the apparent discrepancies between our two studies, as the current research focused on enteric ganglia, which contain mostly neurons and EGC and only a small amount of immune cells (Phillips & Powley, 2012).

The two existing studies on gut expression of LRRK2 in PD, which have both used GI biopsies, have had conflicting results. Using sigmoid biopsy lysates from 12 patients with PD (all Caucasian with no family history of PD) and 11 age-matched controls, we showed that both LRRK2 expression and kinase activity were significantly reduced in the colon of patients with PD when compared with controls (de Guilhem de Lataillade et al. 2021). In a subsequent study, Liao et al. analyzed the expression of LRRK2 by immunohistochemistry in colonic biopsies from 51 patients with PD (3 with LRRK2 R1441H or I2012T mutations, 9 with the PD risk variant G2385R) and 40 controls (Liao et al., 2021). The percentage of cells immunoreactive for LRRK2, which were located in the *lamina propria* and therefore likely of immune origin, was higher in PD subjects when compared with controls. Among subjects with PD, the number of LRRK2-positive cells was higher in those with the LRRK2 mutations and genetic risk variants compared with those without LRRK2 mutations. Although not mentioned in the study, the significant increase in LRRK2-positive cells was likely driven by the few cases with LRRK2 mutations and risk variants. In this setting, our study is the first to analyze the expression levels of LRRK2 in the myenteric plexus of subjects with LB disorders. No difference was observed between LB and non-LB cases when samples from the transverse and descending colon were analyzed. When taken as a whole, the available findings on LRRK2 expression in the GI tract in PD suggest that the expression levels of LRRK2 in the ENS in sporadic PD is either unchanged or only slightly decreased, while an increase in LRRK2 expression could be observed only in subjects bearing LRRK2 mutations. These preliminary findings and hypothesis underscore the fact that future research should be conducted to better characterize the expression levels of LRRK2, but also its phosphorylation status and kinase activity in the human GI tract under physiological conditions, as well as in subjects with idiopathic PD and LRRK2-associated parkinsonism.

The cAMP signaling pathway is one of the key regulators in signal transduction in the brain and there is now mounting evidence to suggest that it is also the case in the ENS. cAMP modulates the neurophysiological properties of enteric neurons (Neylon et al., 2006; Vogalis et al., 2003) and regulates GI motility (Guerra et al., 2020; Howe et al., 2006). We also showed that the activation of the cAMP pathway increased the expression of alpha-synuclein in primary culture of fetal ENS (Paillusson et al., 2010) and more precisely in fetal

enteric neurons as alpha-synuclein is expressed by enteric neurons but not EGC (Paillusson et al., 2010; Prigent, Gonzales, et al., 2019). These observations together with our current findings therefore show that LRRK2 and alpha-synuclein expression share similar regulation by cAMP in enteric neurons. The precise mechanisms leading to LRRK2 and alpha-synuclein upregulation by cAMP in enteric neurons remains, however, to be determined. One possible scenario might imply the transcription factor Sp1, which is activated by cAMP (Rohlf et al., 1997) and has functional responsive elements in both human LRRK2 (Wang & Song, 2016) and alpha-synuclein (Liang & Carr, 2006) gene promoters. One of the intriguing results of our study is the differential effect of cAMP on LRRK2 expression between enteric neurons and EGC. To our knowledge, such a differential regulation of gene/protein expression between enteric neurons and EGC has not been described so far and existing data on signal transduction in the ENS are still scarce especially when compared with the CNS. In this regard, the observation showing that cAMP has differential effects on the extracellular signal-regulated pathways ERK pathway between CNS neurons and astrocytes, deserves to be underlined. This study showed that in neurons, cAMP activated extracellular signal-regulated kinases (ERK), while in astrocytes, cAMP decreased ERK activity and that B-Raf, which is expressed by neurons but not astrocytes, was the molecular switch involved in this differential regulation (Dugan et al., 1999). It is therefore conceivable that such a mode of regulation may occur in the ENS and further studies are needed to evaluate the effects of inhibitors of the ERK signaling pathway on LRRK2 expression in enteric neurons and EGC and to determine if B-Raf is differentially expressed between the two cell types. Finally, when we treated either ENS or EGC cultures with FSK or with cAMP/IBMX for 30 min, we observed a decrease in LRRK2 phosphorylation at Ser935. This is definitely an unexpected result as two previous studies showed that PKA could phosphorylate LRRK2 at Ser935 *in vitro* as well as in cell culture (Li et al., 2011; Muda et al., 2014). Quite remarkably, Muda et al have used a pharmacological approach similar to ours by treating LRRK2-transfected Cos-7 cells with 50 μ M FSK together 100 μ M and IBMX for 30 min (Muda et al., 2014). This strongly suggests that the effects of cAMP/PKA on LRRK2 phosphorylation are cell-type dependent.

In conclusion, our findings are the first to show that EGC express LRRK2 and to identify the cAMP pathway as being involved in the transcriptional regulation of LRRK2. It opens new perspectives on the possible role of LRRK2 in GI physiology and should prompt further studies of enteric glial LRRK2, which could become a new target for modulation of the intestinal tract functions and intestinal disorders. Regarding the pathological aspect, we did not find any significant changes in the expression levels of LRRK2 in subjects with enteric synucleinopathy. These findings suggest that the mere amount of LRRK2 in the GI tract is unlikely to contribute to the development of PD, at least in sporadic forms of the disease. However, future research should be conducted to study the phosphorylation status and kinase activity of LRRK2 in the human GI tract in subjects with idiopathic PD and LRRK2-associated parkinsonism.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ADGDL, MC, and TO performed the experiments. TO, MRD, ET, and EG managed tissue sampling and biobanking. MRD, PN, and PD supervised the study. PN, MN, ET, and CP provided critical feedback and helped shape the research. PD and ADGDL wrote the first draft of the manuscript. MRD, ET, EG, and PD wrote the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Institut des Neurosciences Cliniques de Rennes (INCR), centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens (CECAP), and Parkinsonien de Vendée et du Maine et Loire, FFGP (Fédération Française des Groupements de Parkinsoniens) to ADGDL and PD. We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04) for confocal microscopy pictures.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict(s) of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Pascal Derkinderen  <https://orcid.org/0000-0001-8792-2582>

REFERENCES

- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden, B. P., Neunlist, M., & Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *The FASEB Journal*, *24*, 1082–1094.
- Arranz, A. M., Delbroek, L., Van Kolen, K., Guimarães, M. R., Mandemakers, W., Daneels, G., Matta, S., Calafate, S., Shaban, H., Baatsen, P., De Bock, P. J., Gevaert, K., Vanden Berghe, P., Verstreken, P., De Strooper, B., & Moechars, D. (2015). LRRK2 functions in synaptic vesicle endocytosis through a kinase-dependent mechanism. *Journal of Cell Science*, *128*, 541–552.
- Bannerman, P. G., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (1988). Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia. *Brain Research*, *440*, 99–108.
- Barrenschee, M., Wedel, T., Lange, C., Hohmeier, I., Cossais, F., Ebsen, M., Vogel, I., & Böttner, M. (2017). No neuronal loss, but alterations of the GDNF system in asymptomatic diverticulosis. *PLoS One*, *12*, e0171416.
- Barrenschee, M., Zorenkov, D., Böttner, M., Lange, C., Cossais, F., Scharf, A. B., Deuschl, G., Schneider, S. A., Ellrichmann, M., Fritscher-Ravens, A., & Wedel, T. (2017). Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*, 1.
- Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L., White, I. C. L., Akiyama, H., Caviness, J. N., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., & Walker, D. Ge (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated

alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica*, *119*, 689–702.

- Chapelet, G., Leclair-Visonneau, L., Clairembault, T., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2019). Can the gut be the missing piece in uncovering PD pathogenesis? *Parkinsonism and Related Disorders*, *59*, 26–31.
- Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., Vanden, B. P., & Neunlist, M. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *Journal of Physiology (London)*, *586*, 1963–1975.
- Chow, A. K., Grubišić, V., & Gulbrandsen, B. D. (2021). Enteric Glia Regulate Lymphocyte Activation via Autophagy-Mediated MHC-II Expression. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *12*, 1215–1237.
- Corbillé, A.-G., Clairembault, T., Coron, E., Leclair-Visonneau, L., Preterre, C., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2016). What a gastrointestinal biopsy can tell us about Parkinson's disease? *Neurogastroenterology and Motility*, *28*, 966–974.
- Cossais, F., Durand, T., Chevalier, J., Boudaud, M., Keramarrec, L., Aubert, P., Neveu, I., Naveilhan, P., & Neunlist, M. (2016). Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *310*, G941–G951.
- D'Errico, F., Goverse, G., Dai, Y., Wu, W., Stakenborg, M., Labeeuw, E., De Simone, V., Verstockt, B., Gomez-Pinilla, P. J., Warner, M., Di Leo, A., Matteoli, G., & Gustafsson, L. (2018). Estrogen receptor β controls proliferation of enteric glia and differentiation of neurons in the myenteric plexus after damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*, 5798–5803.
- Devos, D., Leboviev, T., Lardeux, B., Biraud, M., Rouaud, T., Pouclet, H., Coron, E., Bruley des Varannes, S., Naveilhan, P., Nguyen, J. M., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2013). Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *50*, 42–48.
- Dugan, L. L., Kim, J. S., Zhang, Y., Bart, R. D., Sun, Y., Holtzman, D. M., & Gutmann, D. H. (1999). Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *Journal of Biological Chemistry*, *274*, 25842–25848.
- Dugger, B. N., Hoffman, B. R., Scroggins, A., Serrano, G. E., Adler, C. H., Shill, H. A., Belden, C. M., Sabbagh, M. N., Caviness, J. N., Driver Dunkley, E., & Beach, T. G. (2019). Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neuroscience Letters*, *696*, 132–139.
- Dzamko, N., Deak, M., Hentati, F., Reith, A. D., Prescott, A. R., Alessi, D. R., & Nichols, R. J. (2010). Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *The Biochemical Journal*, *430*, 405–413.
- Eaker, E. Y., & Sallustio, J. E. (1994). The distribution of novel intermediate filament proteins defines subpopulations of myenteric neurons in rat intestine. *Gastroenterology*, *107*, 666–674.
- Edwards, L. L., Quigley, E. M., & Pfeiffer, R. F. (1992). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology*, *42*, 726–732.
- Fenyi, A., Leclair-Visonneau, L., Clairembault, T., Coron, E., Neunlist, M., Melki, R., Derkinderen, P., & Bousset, L. (2019). Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification. *Neurobiology of Disease*, *129*, 38–43.
- Filippini, A., Gennarelli, M., & Russo, I. (2021). Leucine-rich repeat kinase 2-related functions in GLIA: an update of the last years. *Biochemical Society Transactions*, *49*, 1375–1384.
- Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B. E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J. R., Rioux, J. D., Daly, M. J., Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2010). LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *Journal of Immunology*, *185*, 5577–5585.



- Gelpi, E., Navarro-Otano, J., Tolosa, E., Gaig, C., Compta, Y., Rey, M. J., Martí, M. J., Hernández, I., Valldeoriola, F., Reñé, R., & Ribalta, T. (2014). Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Movement Disorders*, 29, 1010–1018.
- 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., Lynch, J., Healy, D. G., Holton, J. L., Revesz, T., & Wood, N. W. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 415–416.
- Gómez-Suaga, P., Luzón-Toro, B., Churamani, D., Zhang, L., Bloor-Young, D., Patel, S., Woodman, P. G., Churchill, G. C., & Hilfiker, S. (2012). Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Human Molecular Genetics*, 21, 511–525.
- Guerra, D. D., Bok, R., Lorca, R. A., & Hurt, K. J. (2020). Protein kinase A facilitates relaxation of mouse ileum via phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*, 177, 2765–2778.
- Guilhem de Lataillade, A. d., Verchere, J., Oullier, T., Prigent, A., Durand, T., Pellegrini, C., Neunlist, M., Baron, T., Rolli-Derkinderen, M., & Derkinderen, P. (2021). LRRK2 is reduced in Parkinson's disease gut. *Acta Neuropathologica*, 142, 601–603.
- Hakimi, M., Selvanantham, T., Swinton, E., Padmore, R. F., Tong, Y., Kabbach, G., Venderova, K., Girardin, S. E., Bulman, D. E., Scherzer, C. R., LaVoie, M. J., Gris, D., Park, D. S., Angel, J. B., Shen, J., Philpott, D. J., & Schlossmacher, M. G. (2011). Parkinson's disease-linked LRRK2 is expressed in circulating and tissue immune cells and up-regulated following recognition of microbial structures. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 118, 795–808.
- Howe, D. G., Clarke, C. M., Yan, H., Willis, B. S., Schneider, D. A., McKnight, G. S., & Kapur, R. P. (2006). Inhibition of protein kinase A in murine enteric neurons causes lethal intestinal pseudo-obstruction. *Journal of Neurobiology*, 66, 256–272.
- Hui, K. Y., Fernandez-Hernandez, H., Hu, J., Schaffner, A., Pankratz, N., Hsu, N.-Y., Chuang, L.-S., Carmi, S., Villaverde, N., Li, X., Rivas, M., Levine, A. P., Bao, X., Labrias, P. R., Haritunians, T., Ruane, D., Gettler, K., Chen, E., Li, D., ... Peter, I. (2018). Functional variants in the LRRK2 gene confer shared effects on risk for Crohn's disease and Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 10, eaai7795.
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, 286, 736–737.
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *The Journal of Neuroscience*, 3, 2206–2218.
- Li, X., Wang, Q. J., Pan, N., Lee, S., Zhao, Y., Chait, B. T., & Yue, Z. (2011). Phosphorylation-dependent 14-3-3 binding to LRRK2 is impaired by common mutations of familial Parkinson's disease. *PLoS One*, 6, e17153.
- Liang, T., & Carr, L. G. (2006). Regulation of alpha-synuclein expression in alcohol-preferring and -non preferring rats. *Journal of Neurochemistry*, 99, 470–482.
- Liao, P.-H., Chiang, H.-L., Shun, C.-T., Hang, J.-F., Chiu, H.-M., Wu, M.-S., & Lin, C.-H. (2021). Colonic Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Expression Is Increased and Associated With Disease Severity in Patients With Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 819373.
- Lionnet, A., Wade, M. A., Corbillé, A.-G., Prigent, A., Paillusson, S., Tasselli, M., Gonzales, J., Durieu, E., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Duchalais, E., Neunlist, M., Perkinson, M. S., Hanger, D. P., Noble, W., & Derkinderen, P. (2018). Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathologica Communications*, 6, 65.
- Maekawa, T., Shimayama, H., Tsumura, H., Kawakami, F., Kawashima, R., Kubo, M., & Ichikawa, T. (2017). LRRK2: An Emerging New Molecule in the Enteric Neuronal System That Quantitatively Regulates Neuronal Peptides and IgA in the Gut. *Digestive Diseases and Sciences*, 62, 903–912.
- Marchand, A., Drouyer, M., Sarchione, A., Chartier-Harlin, M.-C., & Taymans, J.-M. (2020). LRRK2 Phosphorylation, More Than an Epiphenomenon. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 527.
- Margolis, K. G., & Gershon, M. D. (2009). Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25, 503–511.
- Mata, I. F., Wedemeyer, W. J., Farrer, M. J., Taylor, J. P., & Gallo, K. A. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease: Protein domains and functional insights. *Trends in Neurosciences*, 29, 286–293.
- Miklossy, J., Arai, T., Guo, J.-P., Klegeris, A., Yu, S., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2006). LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65, 953–963.
- Montminy, M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 807–822.
- Muda, K., Bertinetti, D., Gesellchen, F., Hermann, J. S., Zweydford, F. v., Geerlof, A., Jacob, A., Ueffing, M., Gloeckner, C. J., & Herberg, F. W. (2014). Parkinson-related LRRK2 mutation R1441C/G/H impairs PKA phosphorylation of LRRK2 and disrupts its interaction with 14-3-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, E34–E43.
- Munoz, L., Kavanagh, M. E., Phoa, A. F., Heng, B., Dzamko, N., Chen, E.-J., Doddareddy, M. R., Guillemin, G. J., & Kassiou, M. (2015). Optimisation of LRRK2 inhibitors and assessment of functional efficacy in cell-based models of neuroinflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95, 29–34.
- Neylon, C. B., Fowler, C. J., & Furness, J. B. (2006). Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A. *Autonomic Neuroscience*, 126–127, 258–263.
- Paillusson, S., Tasselli, M., Lebouvier, T., Mahé, M. M., Chevalier, J., Biraud, M., Cario-Toumaniantz, C., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2010). α -Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *Journal of Neurochemistry*, 115, 694–706.
- Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., Brug, M., van der López de Munain, A., Aparicio, S., Martínez Gil, A., Khan, N., Johnson, J., Ruiz Martínez, J., Nicholl, D., Martí Carrera, I., Saenz Peña, A., de Silva, R., Lees, A., Martí-Masso, J. F., Perez-Tur, J., ... Singleton, A. B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44, 595–600.
- Phillips, R. J., & Powley, T. L. (2012). Macrophages associated with the intrinsic and extrinsic autonomic innervation of the rat gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience*, 169, 12–27.
- Prigent, A., Chapelet, G., Guilhem, D., de Lataillade, A., Oullier, T., Durieu, E., Bourreille, A., Duchalais, E., Hardonnière, K., Neunlist, M., Noble, W., Kerdine-Römer, S., Derkinderen, P., Rolli-Derkinderen, M., et al. (2020). Tau accumulates in Crohn's disease gut. *The FASEB Journal*, 34, 9285–9296.
- Prigent, A., Gonzales, J., Durand, T., Le Berre-Scoul, C., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2019). Acute inflammation down-regulates alpha-synuclein expression in enteric neurons. *Journal of Neurochemistry*, 148, 746–760.
- Prigent, A., Lionnet, A., Durieu, E., Chapelet, G., Bourreille, A., Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., & Derkinderen, P. (2019). Enteric alpha-synuclein expression is increased in Crohn's disease. *Acta Neuropathologica*, 137, 359–361.
- Reinhardt, P., Schmid, B., Burbulla, L. F., Schöndorf, D. C., Wagner, L., Glatza, M., Höing, S., Hargus, G., Heck, S. A., Dhingra, A., Wu, G., Müller, S., Brockmann, K., Kluba, T., Maisel, M., Krüger, R., Berg, D., Tsytsyura, Y., Thiel, C. S., ... Sternecker, J. (2013). Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell*, 12, 354–367.

- Rohlf, C., Ahmad, S., Borellini, F., Lei, J., & Glazer, R. I. (1997). Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 21137–21141.
- Scheuermann, D. W., Stach, W., Timmermans, J. P., Adriaensen, D., & De Groodt-Lasseel, M. H. (1989). Neuron-specific enolase and S-100 protein immunohistochemistry for defining the structure and topographical relationship of the different enteric nerve plexuses in the small intestine of the pig. *Cell and Tissue Research*, 256, 65–75.
- Schwartz, A., Spiegel, J., Dillmann, U., Grundmann, D., Bürmann, J., Faßbender, K., Schäfer, K.-H., & Unger, M. M. (2018). Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 50, 104–107.
- Sepulveda, B., Mesias, R., Li, X., Yue, Z., & Benson, D. L. (2013). Short- and long-term effects of LRRK2 on axon and dendrite growth. *PLoS One*, 8, e61986.
- Shankle, W. R., Landing, B. H., Ang, S. M., Chui, H., Villarreal-Engelhardt, G., & Zarow, C. (1993). Studies of the enteric nervous system in Alzheimer disease and other dementias of the elderly: enteric neurons in Alzheimer disease. *Modern Pathology*, 6, 10–14.
- Soret, R., Coquenlorge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., & Neunlist, M. (2013). Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterology and Motility*, 25, e755–e764.
- Steger, M., Tonelli, F., Ito, G., Davies, P., Trost, M., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, E., Duddy, G., Wilson, S., Baptista, M. A. S., Fiske, B. K., Fell, M. J., Morrow, J. A., Reith, A. D., Alessi, D. R., & Mann, M. (2016). Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *eLife*, 5, e12813.
- Streubel-Gallasch, L., Giusti, V., Sandre, M., Tessari, I., Plotegher, N., Giusto, E., Masato, A., Iovino, L., Battisti, I., Arrigoni, G., Shimshek, D., Greggio, E., Tremblay, M. E., Bubacco, L., Erlandsson, A., & Civiero, L. (2021). Parkinson's disease-associated LRRK2 Interferes with astrocyte-mediated alpha-synuclein clearance. *Molecular Neurobiology*, 58, 3119–3140.
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M. M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., & Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300, G976–G987.
- Vogalis, F., Harvey, J. R., & Furness, J. B. (2003). PKA-mediated inhibition of a novel K⁺ channel underlies the slow after-hyperpolarization in enteric AH neurons. *The Journal of Physiology*, 548, 801–814.
- Wang, J., & Song, W. (2016). Regulation of LRRK2 promoter activity and gene expression by Sp1. *Molecular Brain*, 9, 33.
- Westerlund, M., Belin, A. C., Anvret, A., Bickford, P., Olson, L., & Galter, D. (2008). Developmental regulation of leucine-rich repeat kinase 1 and 2 expression in the brain and other rodent and human organs: Implications for Parkinson's disease. *Neuroscience*, 152, 429–436.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., ... Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44, 601–607.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: de Guilhem de Lataillade, A., Caillaud, M., Oullier, T., Naveilhan, P., Pellegrini, C., Tolosa, E., Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Gelpi, E., & Derkinderen, P. (2022). LRRK2 expression in normal and pathologic human gut and in rodent enteric neural cell lines. *Journal of Neurochemistry*, 00, 1–17. <https://doi.org/10.1111/jnc.15704>

LRRK2 expression in normal and pathologic human gut and in rodent enteric neural cell lines

Adrien de Guilhem de Lataillade^a, Martial Caillaud^a, Thibault Oullier^a, Philippe Naveilhan^a, Carolina Pellegrini^b, Eduardo Tolosa^c, Michel Neunlist^a, Malvyne Rolli-Derkinderen^a, Ellen Gelpi^{d,e*} and Pascal Derkinderen^{a*}

Supplementary material 1

Primary cultures of rat ENS (ENS culture)

Small intestine of rat embryos E15, 20–28 per isolation from 2 pregnant Sprague–Dawley rats (Janvier Laboratories SA, Le Genest-St-Isle, France) were removed and finely diced in Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France, Cat# H9259). Tissue fragments were collected and pooled in 8 mL of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM-F12) (1 : 1) (Gibco, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France, Cat# 31330-038) and digested at 37°C for 15 min in 0.1% (w/v) trypsin (Sigma, Cat# T1426). The trypsin reaction was stopped by adding 20 mL of medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Sigma, Cat# F2442) and then treated by 0.01% (w/v) DNase I (Sigma, Cat# DN25) for 10 min at 37°C. After trituration with a 10 mL pipette, cells were centrifuged at 750 rpm for 10 min. Cells were counted and then seeded in the same medium (DMEM-F12 with 10% fetal bovine serum) at a density of 2.4.105 cells/cm² on 24-well plates previously coated for 2 h with a solution of 0.5% (w/v) gelatin (Sigma, Cat# G6144) in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France, Cat# 10010023). After 24 h, the medium was replaced with a serum-free DMEM-F12 (1 : 1) medium containing 1% (v/v) of N-2 supplement (Life Technologies, Cat# 17502-048). Cells were maintained in culture for a maximum of 15 days.

Rat EGC cell line (EGC culture)

EGC culture was obtained from ENS primary culture derived from rat embryonic intestine (see above). After 13 days of culture, primary cultures were trypsinized and seeded in serum-containing media (DMEM 4.5 g/l glucose [Gibco, Cat# 41965-039] supplemented with 10% [vol/vol] of FBS) after differential centrifugation. Following 7 days of culture, isolated areas of morphological glial cells-like were trypsinized using cloning cylinder and seeded in culture flask in serum-containing media.

Primary cultures of rat adult EGC (adult EGC culture)

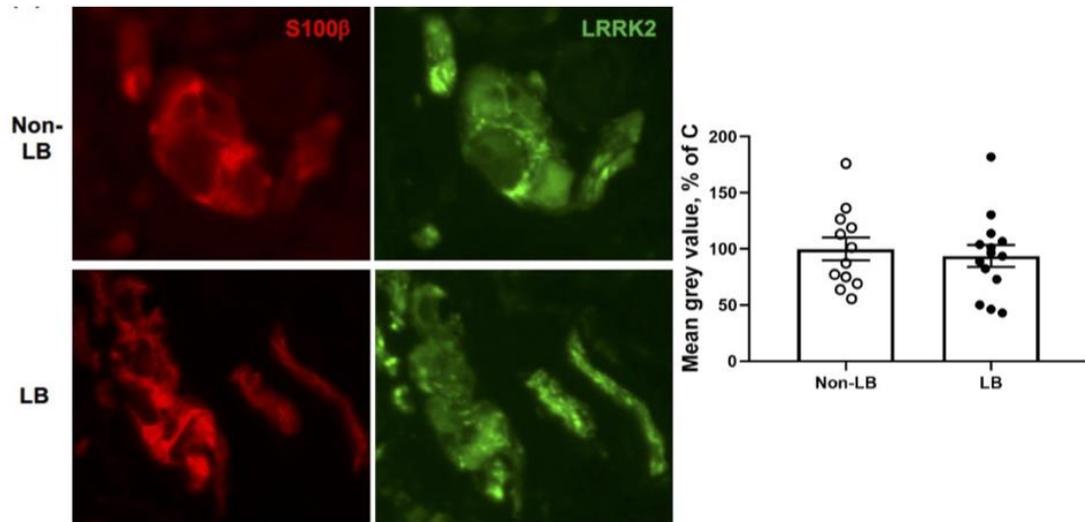
Small intestine rat longitudinal muscle/myenteric plexus (LMMP) was scarified with a scalpel and removed from the underlying mucosa with a pair of fine dissection forceps. The LMMP specimens were collected in GentleMACS tubes C (MiltenyiBiotec, Paris, France, Cat# 130-093-237) containing 5 mL of DMEM/F12 (Gibco, Cat# 31330-038) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1.1 µg/mL amphotericin B, 20 µg/mL gentamicin, 6 mM glutamine, and 2.1 g/L NaHCO₃ (all from Invitrogen); 250 µL protease (type I from bovine pancreas; stock solution: 5 g L⁻¹), 250 µL collagenase (*Clostridium histolyticum*; stock solution: 20 g L⁻¹), and 400 µL bovine serum albumin (BSA; stock solution: 50 g L⁻¹) (all from Sigma-Aldrich, Paris, France) were added to each tube. The tubes were then placed in a GentleMACS dissociator (MiltenyiBiotec) and a mechanical dissociation procedure was performed. Next, the tubes were incubated under gentle agitation on a rocker at 37 °C in a dry incubator for 15 min. At the end of the incubation,

another dissociation program was run prior to the addition of 10 mL of DMEM/F12 supplemented with 10% FCS to each preparation and centrifugation at 425 g for 5 min. The pellets were washed by pipetting up and down 3 times with ice-cold, sterile Krebs solution and after centrifugation were resuspended in 10 mL of DMEM/F12 complete medium. The suspension was then transferred in Petri dishes (\varnothing 10 cm). Petri dishes were placed under a binocular microscope and individual ganglia or interganglionic fiber strands were picked up using a pipette fitted with a 200 μ L sterile round gel-loading tip (Starlab, Bagneux, France). Ganglionic structures numbering 10 to 20 were then seeded in gelatin (gelatin type A from Porcine skin 90–110; 0.5% in phosphate buffered saline [PBS], Sigma-Aldrich) coated 24-well plates and cultured in 500 μ L of DMEM/F12 complete medium for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. After a 48-h, half of the medium was replaced with complete DMEM medium ((Invitrogen), DMEM 4.5 g L⁻¹ glucose, supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 50 IU mL⁻¹ penicillin, 50 μ g mL⁻¹ streptomycin). After 48–72 h, the medium was entirely replaced by complete DMEM medium and the cultures were maintained between 14 and 28 days (P0) with changes of half of the medium every 3 days. After 3–5 days of culture, only wells with clearly identified ganglia were maintained in culture.

Primary cultures of rat enteric neurons (enteric neurons culture)

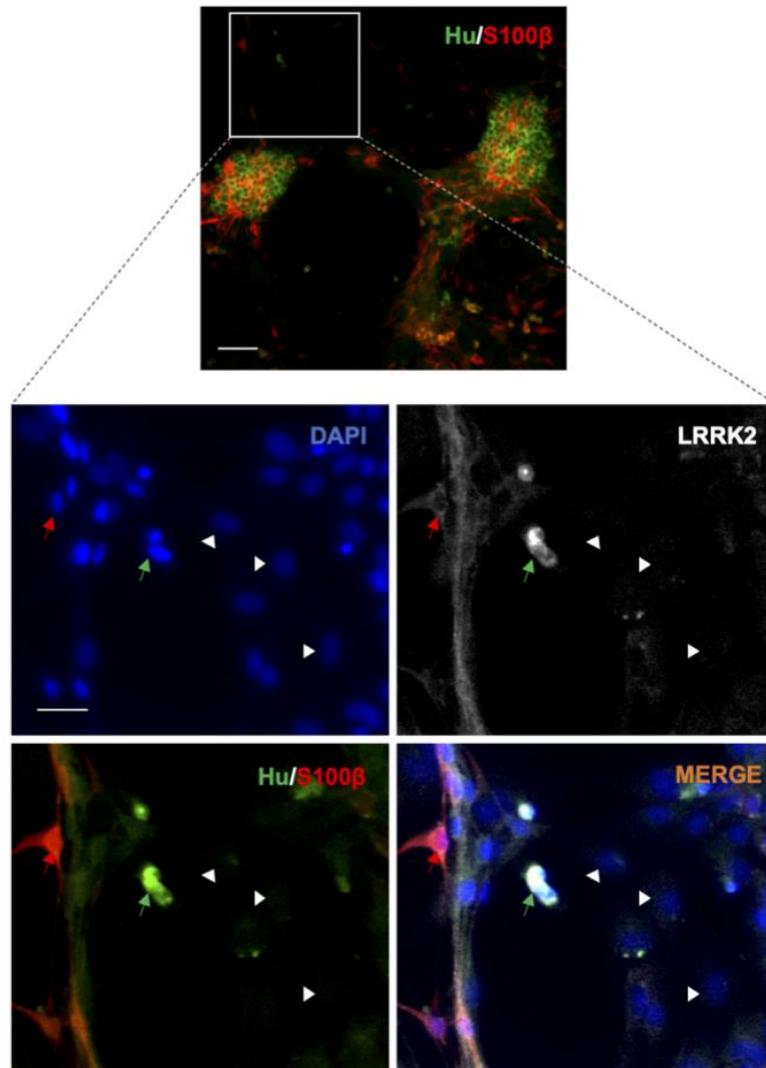
Enteric neurons culture was obtained from the same rat embryonic intestines than ENS primary culture (see above). At 6 days in vitro, the antimetabolic cytosine arabinoside (AraC; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France, Cat# C1768) at 5 μ M was added in a neurobasal medium (Cat# 21103-049- Gibco), supplemented with B27 (Cat# 17504-044- Gibco), GDNF (50ng/mL), 10 mM Glutamine (Cat# 25030-024- Gibco), 50,000 IU Penicillin / 50,000 IU Streptomycin (Cat#15140-122- Gibco), in order to eliminate a maximum of glial and muscle cells and favor neuronal cell enrichment. The enriched neuron culture was treated at 12 days in vitro.

Supplementary figure 1



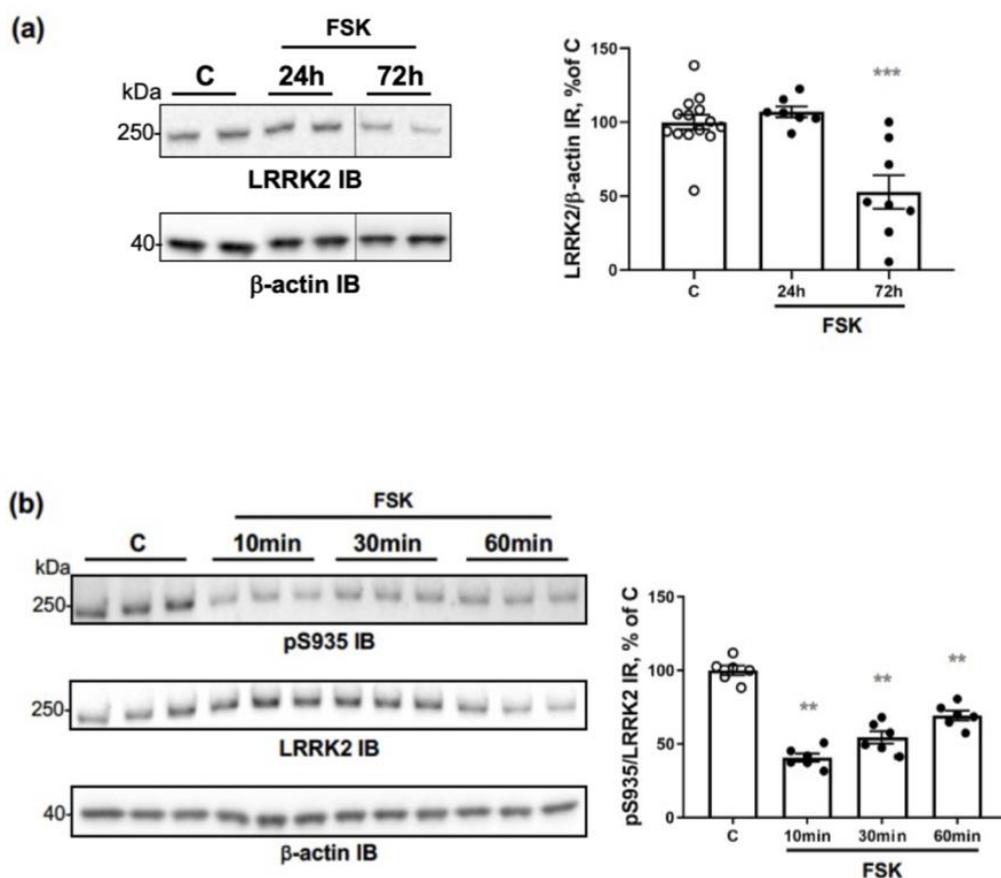
Post-mortem transverse colonic tissues from 15 LB and 12 non-LB disorders subjects (table 1; not available for subject #187) were immunolabeled with rabbit anti-S100 β (red) and goat anti-LRRK2 (green) antibodies. Scale bar is 20 μ m. Representative photomicrographs of one LB and one non-LB cases (#246 and #78 respectively) are shown. Quantitative analysis of LRRK2 immunofluorescence in the sub-mucosal plexus (four per subjects) was performed and shown as mean grey value normalized to controls. Data correspond to mean \pm SEM.

Supplementary figure 2



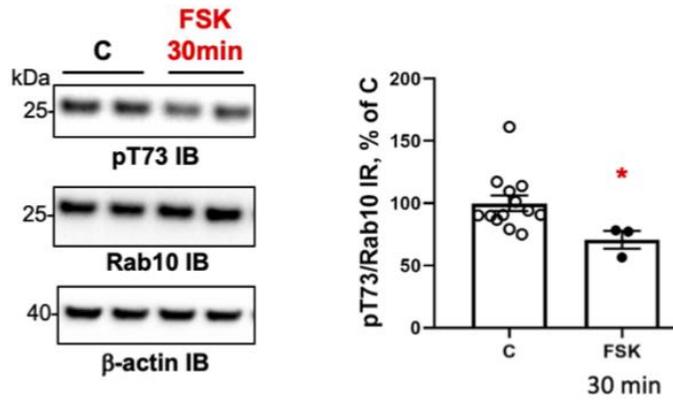
In primary culture of rat ENS, LRRK2 is not expressed in smooth muscle cells. In contrast to neurons (Hu staining, green arrow) and EGC (S100 β staining, red arrow), smooth muscle cells (arrowheads) do not express LRRK2. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars are 50 μ m and 20 μ m (upper and lower panel, respectively).

Supplementary figure 3



(a) Adult EGC culture was treated with 20 μ M of FSK for 24 or 72 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis LRRK2 antibodies (MJFF2). Membranes were also probed with an anti- β -actin antibody to ensure equal loading of protein. The bands have been sliced for presentation purposes in order to show representative images of each experimental group. Data correspond to mean \pm SEM (n=14, 7 and 8 samples for C, 24 and 72h of FSK conditions respectively; treated vs. control ***p < 0.001) **(b)** Adult EGC culture was treated with 20 μ M of FSK for 10, 30 or 60min. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for LRRK2 phosphorylated at S935 and total LRRK2 (MJFF2). Membranes were also probed with an anti- β -actin antibody to ensure equal loading of protein. Data represent means of pS935/total LRRK2 ratio expressed as percentage of control and correspond to mean \pm SEM (n=6 samples per condition; treated vs. control **p < 0.01).

Supplementary figure 4



EGC culture was treated with 20 μ M of FSK for 30 min. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for Rab10 phosphorylated at Thr73 or total Rab10. Membranes were also probed with an anti- β -actin antibody to ensure equal loading of protein. Data represent means of pT73/total Rab 10 ratio expressed as percentage of control and correspond to mean \pm SEM (n=13 and 3 for C and FSK, respectively; treated vs. control *p < 0.05).

Addendum méthodologique

Cet addendum donne des éléments de réponse aux remarques des rapporteurs concernant la spécificité des anticorps anti-LRRK2 et la préparation des échantillons en amont des immunomarquages.

1. Spécificité des anticorps anti-LRRK2

Les anticorps utilisés dans les deux articles proviennent de chez Abcam (ab133474, C41-2, MJFF2) et Everest biothech (EB06550).

La spécificité du C41-2 a été validée sur des prélèvements digestifs de souris KO pour *Lrrk2* dans l'article de Maekawa *et al.* de 2017 (162), aussi bien en western blot qu'en immunofluorescence (figure 1'a et b). Cette spécificité n'a pas été retestée au laboratoire. Lors des premiers western blot, nous nous sommes tout de même assurés que la bande reconnue dans les cultures de SNE et les prélèvements humains de tube digestif co-migrerait bien avec celle reconnue dans une lignée cellulaire monocyttaire (Raw 264.7) (figure 1'c). L'épitope reconnu par cet anticorps se situe entre l'acide aminé 950 et la partie C-terminale de la protéine, la séquence exacte n'étant pas communiquée par le fournisseur.

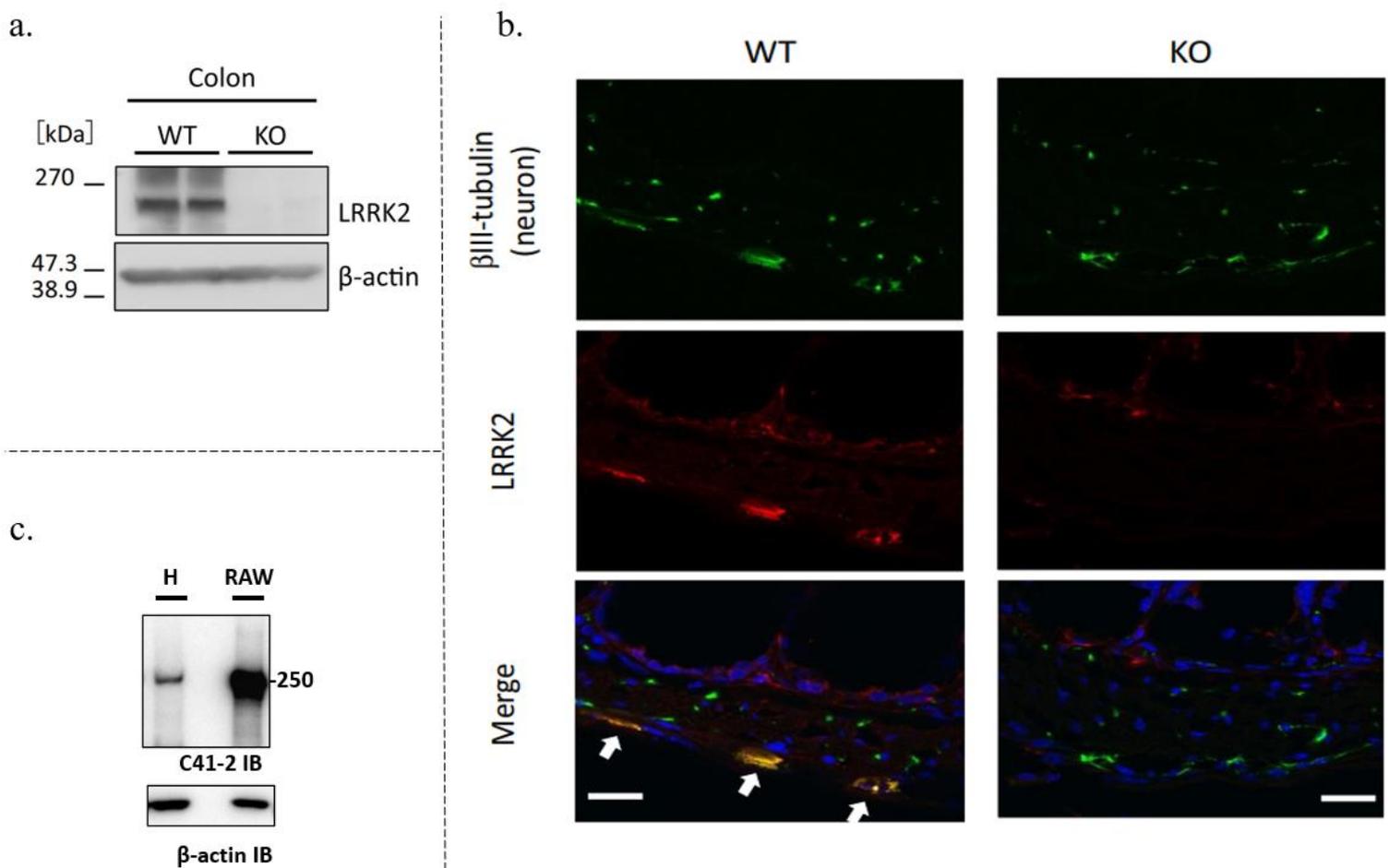


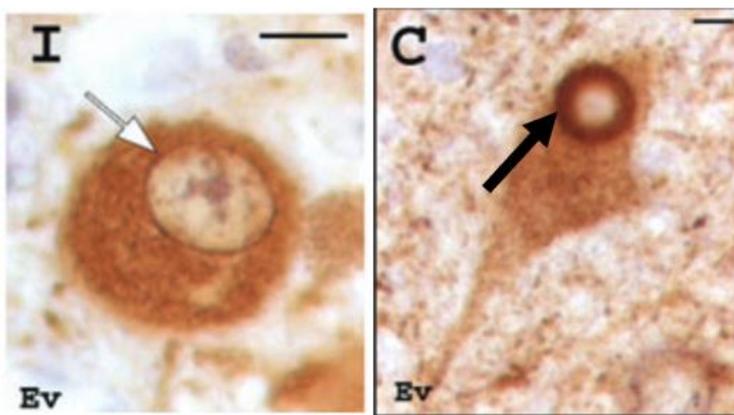
Figure 1' : Caractérisation de l'anti-LRRK2 C41-2. a et b. Western blot puis immunofluorescence LRRK2 rapportant l'absence de signal chez les souris KO pour *Lrrk2* en comparaison des souris sauvages (WT pour wild type). Adapté de Maekawa *et al.* (162). **c.** Données non publiées rapportant la co-migration des bandes révélées par l'anti-LRRK2 C41-2 entre une biopsie digestive humaine (H) et un lysat de la lignée RAW 264.7 (RAW) en western blot.

L'anticorps EB06550 a été moins bien caractérisé. Il est notamment utilisé dans deux articles qui étudient des coupes congelées ou incluses en paraffine de SNC normal et pathologique en immunohistochimie (169,170). Ceux-ci rapportent un signal similaire, localisé dans le cytoplasme des neurones et dans le halo des CL (figure 2'a et b). L'un des deux présente également un western blot sur des lysats de SNC avec détection d'une bande unique (pas d'autre protéine reconnue jusqu'à au moins 250kDa) et mentionne la disparition du signal après incubation avec le peptide immunisant (figure 2'c) (170). Aucun test supplémentaire n'a été réalisé au laboratoire (pas de test sur échantillons KO pour *LRRK2*, pas de corrélation avec l'ARNm). L'épitope reconnu correspond aux acides aminés 2015 à 2026 (CELAEKMRRTSV). Le logiciel Blastp identifie cette séquence sur trois autres protéines :

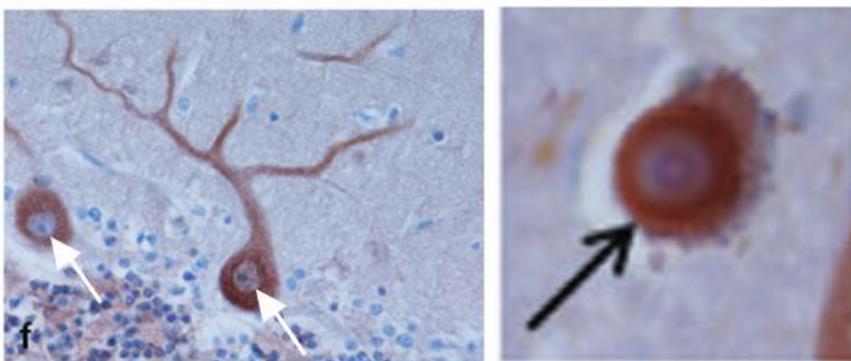
- YTH domain-containing protein 1 qui est une protéine ubiquitaire, localisée notamment dans le noyau, et qui joue un rôle dans l'épissage alternatif (The Human Protein Atlas). Cette protéine n'est probablement pas révélée par l'anticorps EB06550 car aucun des immunomarquages ne donne un signal intra-nucléaire, elle n'est pas connue comme étant plus exprimée par les cellules neurales que par les cellules musculaires lisses du tube digestif et aucune bande compatible n'apparaît en western blot (attendue entre 80 et 85kDa ; figure 2'c).

- EAW57815.1 et CAD39185.1 qui sont des protéines théoriques sans validation qu'un transcrit soit effectivement traduit.

a.



b.



c.

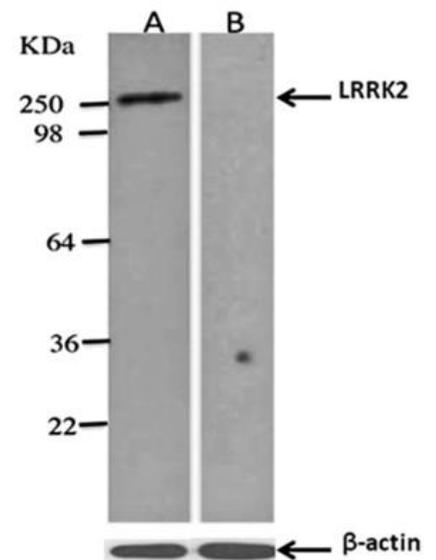


Figure 2' : Caractérisation de l'anti-LRRK2 EB06550. a et b. Immunohistochimie LRRK2 sur prélèvement de SNC rapportant un signal neuronal cytoplasmique, absent du noyau (flèches blanches) et présent dans le halo des CL (flèches noires). Adapté de Alegre *et al.* puis Sharma *et al.* (169,170). **c.** Western blot LRRK2 rapportant l'absence de signal sur un lysat pré-traité avec le peptide immunisant (B) en comparaison d'un lysat non traité (A). Adapté de Sharma *et al.* (170).

Au total, la caractérisation de l'anti-LRRK2 C41-2 est documentée et sa spécificité a été montrée dans le tube digestif de souris. La méthode de production des anticorps monoclonaux issus du lapin permettant une stabilité du produit à travers les lots, on peut considérer que nos résultats sont interprétables à la lumière de cette caractérisation. En revanche, l'anticorps EB06550 n'a pas, à notre connaissance, été testé en condition KO pour *Lrrk2*. Même si certains éléments sont en faveur d'une reconnaissance spécifique de LRRK2 (pas d'autres bande en western blot, signal purement cytoplasmique cohérent entre les différentes études, pas d'autre candidat compatible sur Blastp), la spécificité ne peut être assurée dans notre étude. Le choix de privilégier l'anticorps EB06550 pour les expériences d'immunofluorescence dans l'article 2 est lié au fait que, si les deux anticorps marquaient bien le SNE, le C41-2 donnait beaucoup plus de bruit de fond (voir Article 2, figure 3a).

2. Préparation des immunomarquages

La préparation des échantillons inclus en paraffine a toujours compris une étape de récupération/démasquage des antigènes par la chaleur (avec autocuiseur). Celle-ci se déroulait soit avec un tampon acide (protocole standard du laboratoire), soit avec un tampon basique (uniquement lors d'un multi-marquage incluant l'anticorps anti-Hu A-21271 qui ne fonctionne pas avec une récupération antigénique acide). Les deux anti-LRRK2 fonctionnent avec les démasquages acide et basique ; bien qu'une comparaison directe n'ait pas été réalisée, le signal semblait similaire entre ces deux conditions. Chaque expérience d'immunofluorescence comprenait toujours un échantillon ne recevant pas d'anticorps primaire (uniquement les secondaires) pour servir de contrôle négatif ; seul le signal détecté au-delà du bruit de fond du contrôle négatif était interprété comme significatif.

Les traitements utilisés sur les cultures cellulaires dans l'article 2 étaient dilués soit dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (forskoline et IBMX), soit dans l'eau distillée (8-Br-cAMP). Dans tous les cas, les puits témoins recevaient une quantité de solvant équivalente à celle administrée aux puits traités.

La préparation de lysats en amont du western blot comprenait toujours une étape de sonication. Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse visaient à étudier LRRK2 en condition dénaturante, c'est-à-dire avec une volonté de ne pas conserver les conformations 3D ni les associations homo ou hétéro-multimériques, dans le but d'analyser un signal unique correspondant au monomère de LRRK2. Nous avons envisagé d'étudier un signal qui pouvait correspondre à un dimère (figure 3'a), malheureusement celui-ci était peu reproductible en condition dénaturante. Nous avons tout de même souhaité valider si oui ou non ce signal correspondait à un dimère de LRRK2, ce pourquoi nous avons réalisé du cross-linking (création de ponts moléculaires entre les protéines en interaction). Cette expérience n'a pas été concluante, les formes multimériques de LRRK2 apparaissant sous la forme d'un signal continu au-delà de 170kDa (figure 3'b). L'étude des formes multimériques de LRRK2 nécessite donc une importante mise au point technique et un travail en condition non dénaturante, comme décrit dans le matériel et méthode de l'article de 2012 d'Ito et Iwatsubo(171), l'ensemble étant au-delà des objectifs définis pour cette thèse. Concernant les formes tronquées, nous avons identifié une bande reproductible et reconnue par plusieurs anti-LRRK2 différents à environ 170kDa, tronquée au niveau N-terminal (figure 3'c). Nous avons choisi de ne pas plus analyser cette forme tronquée de LRRK2 car elle ne semblait pas régulée comme la forme monomérique entière (figure 3'd).

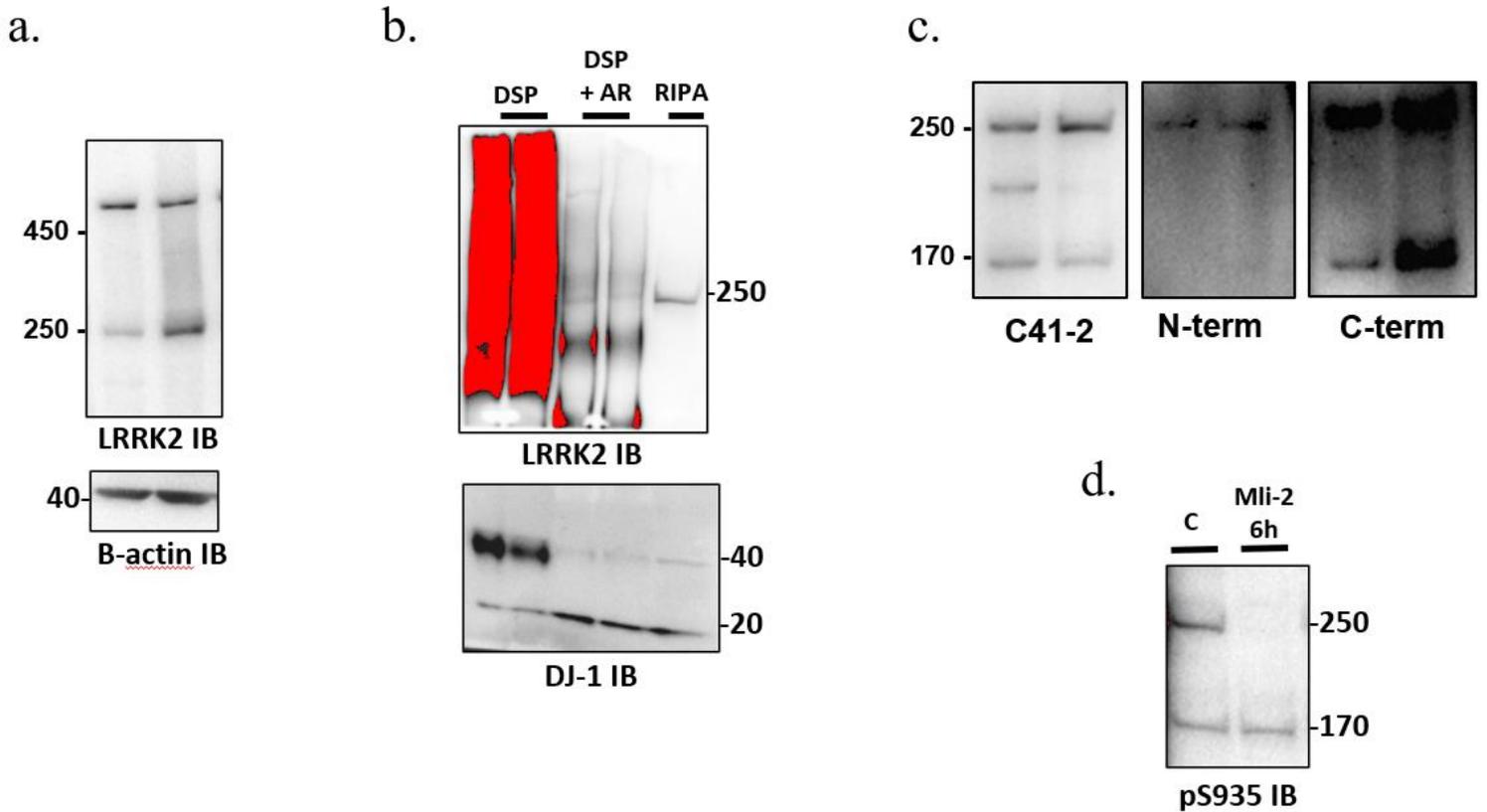


Figure 3' : Etude des différentes conformations de LRRK2. **a.** Western blot de biopsies coliques humaines rapportant une bande à environ 500kDa suite à l'hybridation avec le C41-2. **b.** Cross-linking de Lrrk2 sur culture de SNE. DJ-1 sert de contrôle positif étant donné que cette protéine forme naturellement des homo-dimères. Le DSP (dithiobis(succinimidyl propionate) crée des ponts moléculaires entre les protéines en interaction (dimère DJ-1 à 40kDa). L'ajout d'agent réducteur (AR) permet de rompre les liaisons créées par le DSP (disparition du dimère DJ-1). En condition dénaturante (RIPA), il n'y a pas de formation multi-mérique, ni pour Lrrk2 ni pour DJ-1. **c.** Western blot LRRK2 de biopsies coliques humaines. Les anti-LRRK2 C41-2 et C-terminal reconnaissent une bande à 170kDa qui n'est pas reconnue par l'anti-N-terminal. **d.** Le Mli-2 (inhibiteur de l'activité kinase de LRRK2) entraîne une phosphorylation du monomère LRRK2 (250kDa) en S935 mais pas de la forme tronquée (170kDa).

Discussion

L'objet de cette discussion de thèse est de compléter la discussion des articles scientifiques, parfois limitée par les contraintes de mise en forme (article 1 principalement), en y intégrant des données non publiées.

1. LRRK2 dans les cellules immunitaires digestives de la *lamina propria* et MP

La **baisse** du niveau d'expression de **LRRK2** dans les **biopsies** de sujets parkinsoniens, mesurée en western blot avec un résultat cohérent en RT-PCR, est discutée dans les deux articles. Si la conclusion de notre premier article évoque la possibilité que ce signal LRRK2 soit d'origine neurale, le deuxième article apporte des arguments plutôt en défaveur de cette première hypothèse. En effet, nous y rapportons que l'expression protéique de LRRK2, évaluée spécifiquement par immunofluorescence dans le plexus myentérique des colons transverse et descendant, ainsi que dans le plexus sous-muqueux du colon descendant, par deux anticorps anti-LRRK2 différents, n'est pas modifiée par l'existence d'une pathologie de type Lewy dans le SNE. De plus, bien que les biopsies puissent capturer du SNE sous-muqueux (voir chapitre III-1-b), il peut arriver que la biopsie soit trop superficielle, ou que le prélèvement tombe sur une zone entre deux ganglions ; la part de SNE par biopsie est ainsi variable (172). Ces deux arguments, en plus des travaux de Gardet *et al.* qui rapportent une expression essentiellement immunitaire de LRRK2 dans des biopsies de sujets atteints de MICI (60), laissent supposer un signal tissulaire de LRRK2 **plutôt d'origine immunitaire** dans les biopsies.

Un article, paru au cours de ma thèse, est d'un intérêt particulier dans ce contexte : l'étude s'intéresse à l'expression de LRRK2 dans les biopsies de sujets parkinsoniens mais en quantifiant le nombre de cellules positives pour LRRK2 en immunohistochimie (173). Le résultat montre qu'il pourrait y avoir une augmentation de ce nombre de cellules dans la MP idiopathique (le résultat est douteux (174) car la différence est principalement liée à des patients non idiopathiques porteurs du variant G2385R [voir chapitre II-5.a]), mais en tous cas qu'il n'y a **pas moins de cellules positives pour LRRK2 dans la *lamina propria*** de ces patients. Moins de signal avec autant de cellules suggère un **mécanisme de diminution de l'expression**. La voie ERK5, décrite dans une lignée monocyttaire, pourrait être impliquée (voir figure 10a), mais nos données (voir Article 1, figure supplémentaire 2) ne rapportent pas de diminution de l'INF- γ (supposé être en amont de cette voie [voir chapitre II-4.c]) chez les sujets parkinsoniens, ni de corrélation des niveaux d'expression de *LRRK2* et d'INF- γ (voir figure 9c).

Dans les **cellules immunitaires**, plusieurs rôles de **LRRK2** ont été décrits. On peut retenir son implication dans les processus d'**élimination des pathogènes** intracellulaires, ainsi que dans la **modulation de l'inflammation**, un « gain de fonction » de LRRK2 étant associé à une augmentation de la **production de cytokines pro-inflammatoires**, dont le TNF- α (41). Dans nos échantillons, le niveau de TNF- α n'était pas différent entre sujets témoins et parkinsoniens, mais corrélait bien avec le niveau d'expression de *LRRK2*, contrairement aux cytokines IL-1 β et INF- γ (voir figure 9).

Une **hypothèse** peut alors être formulée : chez les **sujets parkinsoniens** étudiés dans l'article 1, une régulation à la **baisse** de l'expression de **LRRK2** permet de **diminuer l'inflammation digestive** associée à la maladie pour revenir au niveau des sujets témoins, particulièrement via la réduction de production de TNF- α (voir figure 10a) ; il s'agirait ici d'un mécanisme protecteur permettant notamment de diminuer l'effet délétère de l'inflammation digestive sur le SNC (voir chapitre III-3.f). Un argument qui s'oppose à cette hypothèse est l'aggravation de la colite au DSS induite chez les souris porteuses de cellules myéloïdes KO pour *Lrrk2* (167) ; mais ces résultats s'avèrent contradictoires avec d'autres (voir chapitre IV-3.c) et on peut se demander si un KO en amont de la genèse de l'inflammation est comparable à une régulation plus fine de *LRRK2* en réponse à celle-ci. Un second argument contre est que LRRK2 affiche plutôt un profil « gain de fonction » dans les différents types de cellules immunitaires circulantes des sujets parkinsoniens (175–178) ; l'hypothèse formulée correspondrait donc à une réaction spécifique aux cellules immunitaires de la *lamina propria* digestive. A l'inverse, le possible effet neuroprotecteur des anti-TNF- α s'intègre bien dans cette hypothèse. En effet, celui-ci est suspecté chez l'homme sur des données épidémiologiques rétrospectives (voir chapitre III-3.c). Il a également été montré sur un modèle murin de MP alliant expression transgénique de LRRK2 G2019S et colite au DSS(173).

Pour **tester** ce scénario, la première étape consisterait à identifier le mécanisme responsable de la diminution de l'expression de *LRRK2* dans ces cellules immunitaires digestives de la *lamina propria* ; une possibilité serait de rechercher une baisse d'activité de la **voie ERK5** dans les biopsies de nos sujets parkinsoniens de l'article 1, en évaluant par exemple en western blot la phosphorylation de ERK5 (179).

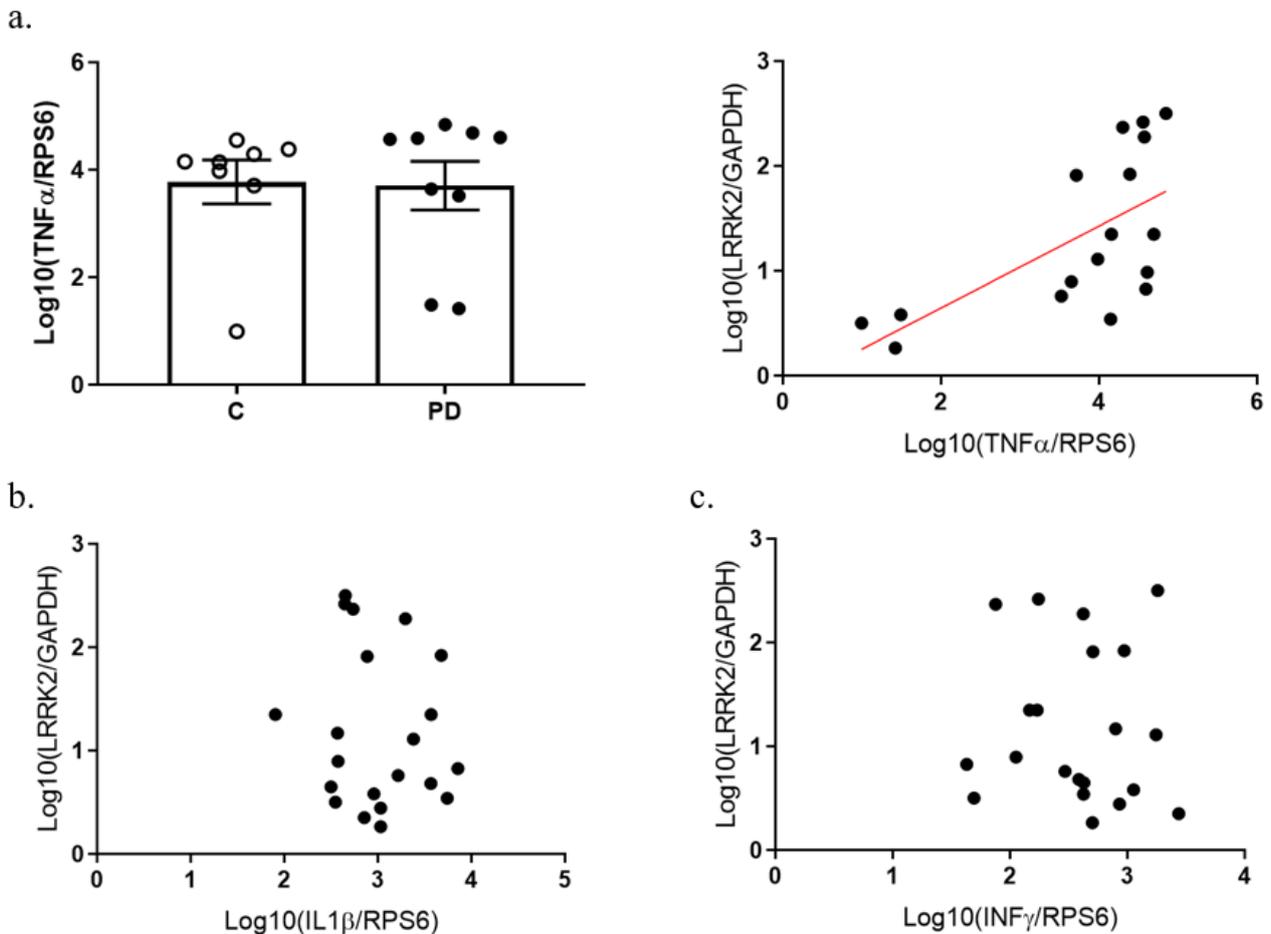


Figure 9 : Cytokines pro-inflammatoires et *LRRK2* dans les biopsies des sujets parkinsoniens de l'article 1. **a.** Résultat de RT-PCR pour TNF- α (8 sujets C et 9 « PD ») puis corrélation avec l'ARNm de *LRRK2* ($r = 0,68$, $p < 0,01$). **b.** Corrélation des résultats de RT-PCR pour les ARNm d'IL-1 β et de *LRRK2* (10 sujets C et 11 MP ; $r = -0,09$, $p = 0,7$). **c.** Corrélation des résultats de RT-PCR pour les ARNm d'INF- γ et de *LRRK2* (10 sujets C et 11 MP ; $r = -0,12$, $p = 0,6$). Abréviations : PD : Parkinson's disease

2. *LRRK2* dans les CGE muqueuses et MP

Malgré l'absence de modification du niveau d'expression de *LRRK2* dans les ganglions du SNE, on ne peut pas exclure que la diminution de signal *LRRK2* sur les biopsies provienne en partie des **CGE muqueuses**, d'autant plus qu'une possible réaction gliale entérique a été documentée dans la MP sur des prélèvements équivalents (voir chapitre III-1.b).

Le rôle de *LRRK2* dans les CGE est inconnu étant donné que nous sommes les premiers à montrer son expression dans ces cellules (Article 2). Les CGE ont de nombreux points communs avec les astrocytes du SNC (voir chapitre III-1.b), il est donc logique de supposer que *LRRK2* a des fonctions communes dans ces deux types cellulaires. Dans les astrocytes, *LRRK2* est connue pour

moduler le système endo-lysosomal et la capacité de **dégradation de l' α -synucléine**, un profil « gain de fonction » étant associé à une moindre élimination d' α -synucléine(83). Dans ce paradigme, une **baisse** de l'expression de **LRRK2** dans les CGE muqueuses des **sujets parkinsoniens** pourrait correspondre à une réaction de ces cellules pour participer à l'élimination de l' α -synucléine pathologique qui peut exister dans les prolongements neuronaux à destinée muqueuse (voir figure 5) : il s'agirait ici à nouveau d'un **mécanisme protecteur**, dirigé cette fois-ci principalement vers les **neurones entériques** (voir figure 10b). Cette hypothèse est confortée par la propriété de neuroprotection qu'a montré le knock-down de *Lrrk2*, par oligonucléotides anti-sens injectés dans le liquide cérébro-spinal, dans un modèle murin exposé à une injection intracérébrale d' α -synucléine pathologique (180). L'absence de perte neuronale identifiée dans le SNE des sujets parkinsoniens (voir chapitre III-2.b), contrairement au SNC, s'intègre bien dans cette hypothèse d'un mécanisme protecteur propre aux CGE muqueuses, d'autant plus que les dépôts d' α -synucléine semblent plus nombreux dans le plexus myentérique que dans le plexus sous-muqueux (103).

Une **autre fonction** de LRRK2 dans les astrocytes est, à l'image des cellules immunitaires, de contrôler la **production de cytokines pro-inflammatoires** (83), les astrocytes étant notamment capables de synthétiser du TNF- α (181). On pourrait donc reprendre au compte des CGE muqueuses l'**hypothèse** formulée précédemment (voir Discussion-1) d'une **baisse de LRRK2** qui **régule l'inflammation digestive** de la MP dans le cadre d'un mécanisme protecteur (voir figure 10a).

Pour ces deux hypothèses autour des CGE muqueuses, le mécanisme de régulation de *LRRK2* pourrait être une activation de la voie AMPc (voir figure 10a et b) dont nous montrons dans l'article 2 qu'elle régule à la baisse *Lrrk2* dans des cultures de CGE de rat. Ce double scénario neuroprotecteur est compatible avec les résultats montrant qu'une neuroprotection est obtenue par un inducteur de la voie AMPc, le Rolpiram, dans un modèle de souris MPTP (182). Il existe même des données cohérentes pour l'hypothèse anti-inflammatoire digestive montrant que l'activation de la voie AMPc diminue la production de TNF- α dans des cultures d'astrocytes (183). De manière à explorer cette hypothèse, il serait intéressant d'**étudier** l'activation de la voie AMPc dans les biopsies de nos sujets parkinsoniens de l'article 1, en évaluant par exemple en western blot la **phosphorylation du résidu sérine 133 de CREB** (*c-AMP Response Element-Binding protein*), l'un des principaux effecteurs de cette voie (183).

Mais la première chose à faire dans le cadre de ces hypothèses impliquant les **CGE muqueuses** serait de **s'assurer de leur expression de LRRK2** dans des prélèvements humains, car nous nous sommes focalisés dans l'article 2 sur les CGE du plexus myentérique.

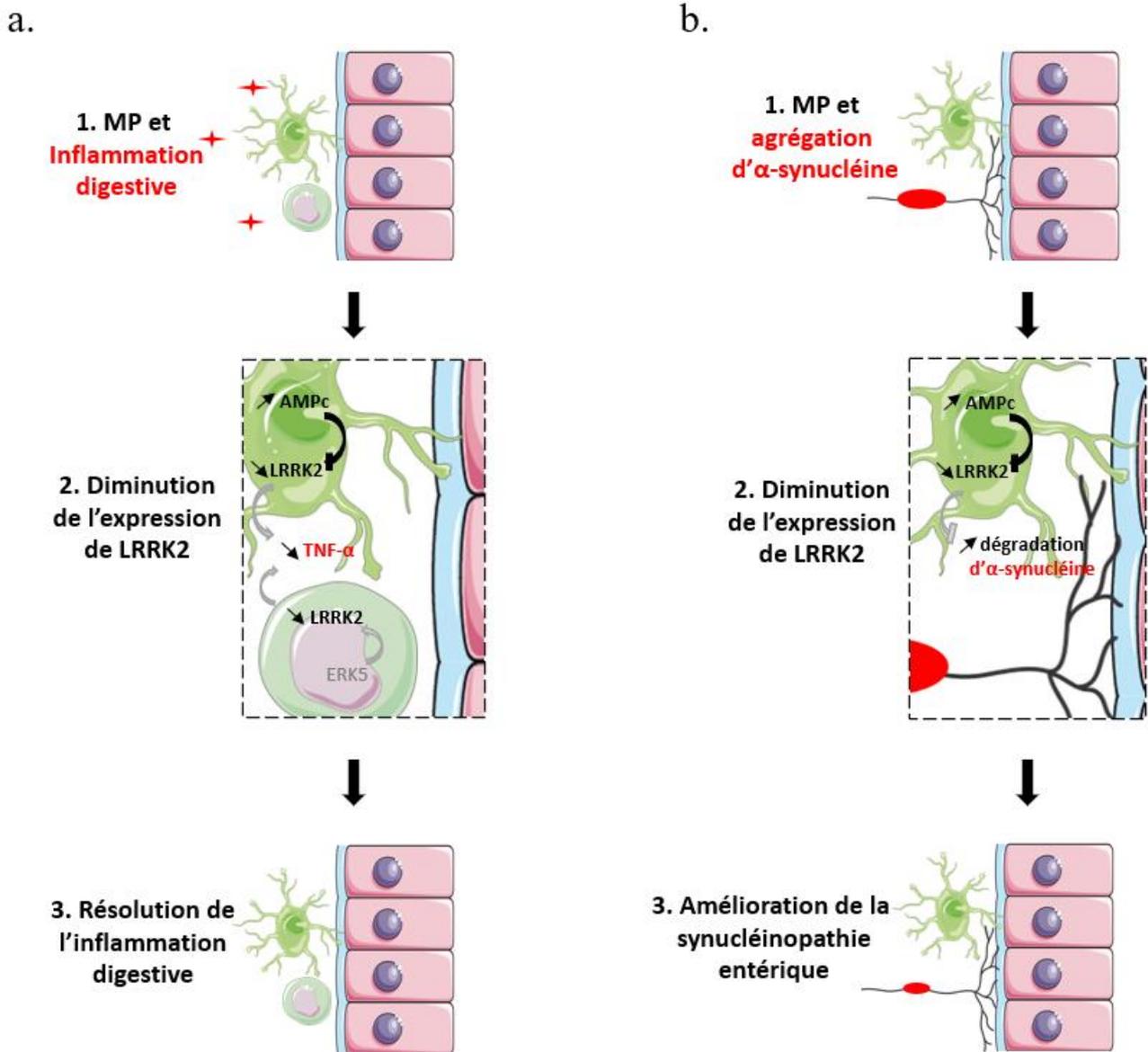


Figure 10 : Hypothèses sur la baisse de LRRK2 entérique dans la MP. **a.** En réaction à l'inflammation digestive de la MP, l'expression de LRRK2 est diminuée dans les cellules immunitaires de la *lamina propria* (voie ERK5) et dans les CGE muqueuses (voie AMPc) permettant une diminution de la synthèse de TNF- α et une résolution de l'inflammation. **b.** En réaction aux dépôts pathologiques d' α -synucléine dans les neurones entériques, l'expression de LRRK2 est diminuée dans les CGE muqueuses (voie AMPc) permettant un catabolisme plus efficace de l' α -synucléine anormale et une meilleure survie des neurones entériques. Illustrations tirées de Servier Smart Art.

3. LRRK2 entérique et maladie de Crohn

Nous discutons dans l'article 1 le fait que les **mécanismes pathologiques** médiés par **LRRK2 entérique** dans les **MC et MP** sont probablement **différents**. En effet, contrairement à celles des sujets parkinsoniens, les **biopsies** prélevées en **zones coliques inflammées** des sujets atteints de **MC** rapportent une **augmentation de l'expression de LRRK2** en comparaison des zones non inflammées (60) ou des sujets témoins (voir Article 1, figure supplémentaire 3).

Etant donné que, contrairement aux informations disponibles pour la MP, nous ne possédons pas d'évaluation du nombre de cellules positives pour LRRK2 dans la *lamina propria* des sujets avec une MC, **l'hypothèse** suivante peut être formulée : l'augmentation du signal LRRK2 dans les biopsies est en lien avec un **recrutement de cellules immunitaires circulantes** dans les zones inflammées. Cette hypothèse est compatible avec le niveau important d'expression de LRRK2 par les cellules immunitaires circulantes (60), particulièrement par les neutrophiles et monocytes (41,177). Elle est également appuyée par des données montrant effectivement un recrutement actif de monocytes circulants dans la muqueuse inflammée des patients atteints de MC (184). De même, nos données non publiées s'intègrent bien dans ce cadre : lorsque l'on normalise en western blot le signal LRRK2 avec le signal CD11b, une intégrine exprimée notamment sur les monocytes/macrophages et les neutrophiles (185), le niveau d'expression de LRRK2 s'équilibre entre sujets témoins et porteurs d'une MC ; de plus, ce signal CD11b est bien corrélé aux niveaux d'expression protéique et génique de LRRK2 (voir figure 11). Dans cette hypothèse, l'augmentation de LRRK2 dans les biopsies de zones inflammatoires serait le simple reflet d'une infiltration immunitaire du tissu. Un argument contre cette première hypothèse est que le recrutement de monocytes dans les muqueuses inflammées est aussi rapporté dans la RCH (184) alors que, contrairement à la MC, l'expression de *LRRK2* n'est pas modifiée entre les biopsies faites en zones saines et inflammées (60).

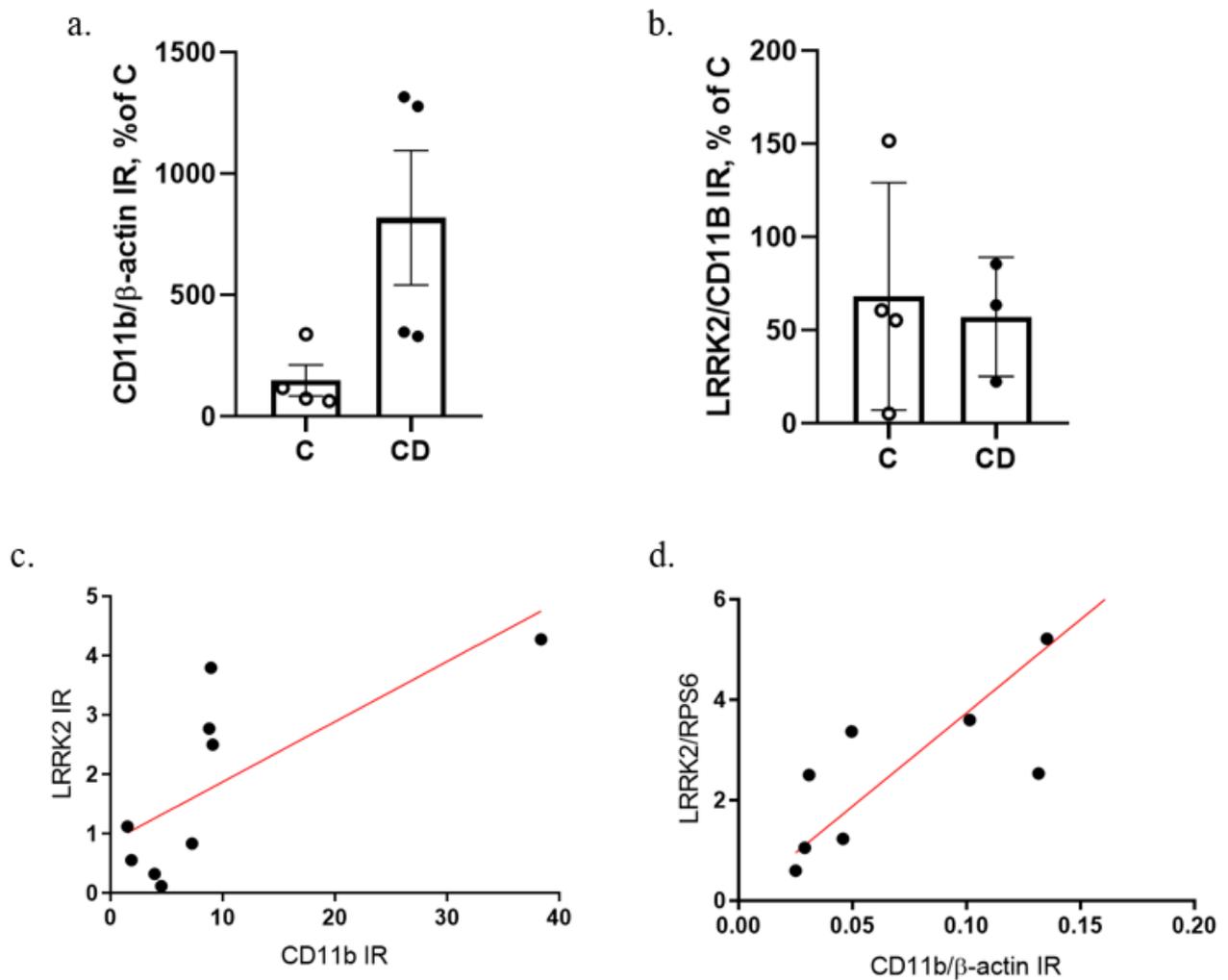


Figure 11 : CD11b et LRRK2 dans les biopsies des patients porteurs d'une MC de l'article 1. a. Quantification en western blot (WB) de CD11b, normalisée sur la β -actine (4 sujets C et 4 « CD »). **b.** Quantification en WB de LRRK2, normalisée sur CD11b (4 sujets C et 3 « CD »). **c.** Corrélation des résultats de WB pour CD11b et LRRK2 (4 sujets C et 5 MC ; $r = 0,72$, $p < 0,05$). **d.** Corrélation des résultats de RT-PCR pour *LRRK2* avec la quantification en WB de CD11b (3 sujets C et 5 MC ; $r = 0,93$, $p < 0,001$). Abréviations : CD : Crohn's disease

On ne peut donc pas exclure que, en miroir des hypothèses formulées plus haut pour la MP (voir Discussion-1 et 2), cette **surexpression de LRRK2** soit liée à sa régulation à la hausse dans les **cellules immunitaires résidentes** de la *lamina propria* et/ou dans les CGE. Dans cette 2^{ème} hypothèse, l'expression forte de LRRK2 pourrait être à la fois la cause et la conséquence de la **production accrue de cytokines pro-inflammatoires** (voir figure 15a). En effet, nos données non publiées sur les patients MC de l'article 1 rapportent une bonne corrélation de *LRRK2* avec l'ensemble des cytokines pro-inflammatoires testées (TNF- α , IL-1 β , IL6 et INF- γ [voir figure 12]), l'INF- γ pouvant être à l'origine d'une augmentation de LRRK2 par activation de la voie ERK5 dans les cellules immunitaires (voir chapitre II-4.c). De manière intéressante, une étude montre qu'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IFN- γ) diminue l'AMPc dans les astrocytes (186), ouvrant également la possibilité que ces cytokines, dont l'INF- γ , induisent une augmentation de LRRK2 dans les CGE par inhibition de la voie AMPc chez les patients MC de l'article 1.

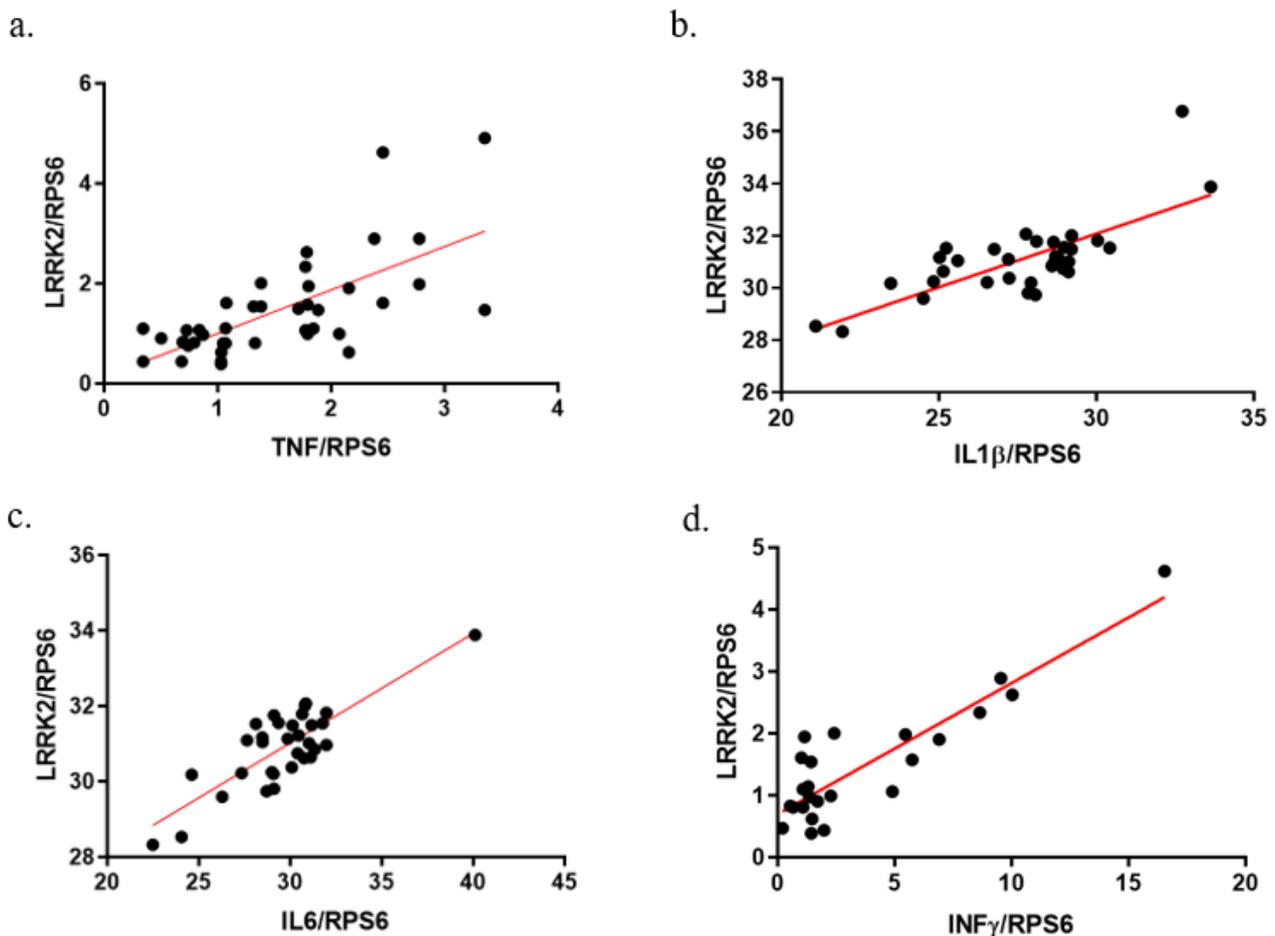


Figure 12 : Cytokines pro-inflammatoires et *LRRK2* dans les biopsies des patients de l'article 1 et d'autres porteurs d'une MC. Pour les quatre corrélations, les données sont issues de 13 biopsies de sujets C, 13 de patients MC prélevées en zone inflammée et 13 des mêmes patients MC mais prélevées en zone non inflammée. Corrélation des résultats de RT-PCR pour les ARNm de *LRRK2* et de **a.** TNF- α ($r = 0,67$, $p < 0,0001$), **b.** IL-1 β ($r = 0,64$, $p < 0,0001$), **c.** IL-6 ($r = 0,59$, $p < 0,001$) et **d.** INF- γ ($r = 0,65$, $p < 0,001$)

L'augmentation de l'expression de LRRK2 dans les CGE pourrait en outre participer à l'augmentation d'expression d' α -synucléine mise en évidence dans des biopsies de sujets atteints de MC(126) Ce phénomène a été montré comme étant au moins en partie dû à une défaillance de l'autophagie gliale médiée par Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*) (187). Nos données non publiées montrent que l'expression de LRRK2 corrèle négativement avec celle de Nrf2 dans les biopsies des sujets atteints de MC (voir figure 13a) et que, à l'image de l' α -synucléine et de Tau (187), le niveau de Lrrk2 est diminué après l'activation de Nrf2 par le sulforafane dans la culture primaire de SNE (voir figure 13b). Ceci suggère que les diminutions d'expression de Nrf2 et de son effecteur NDP52 (*nuclear dot protein 52 kDa*) dans les biopsies de sujets atteints de la MC (187) **altèrent l'élimination gliale d' α -synucléine** au moins en partie via l'augmentation d'expression de LRRK2 (voir figure 15b).

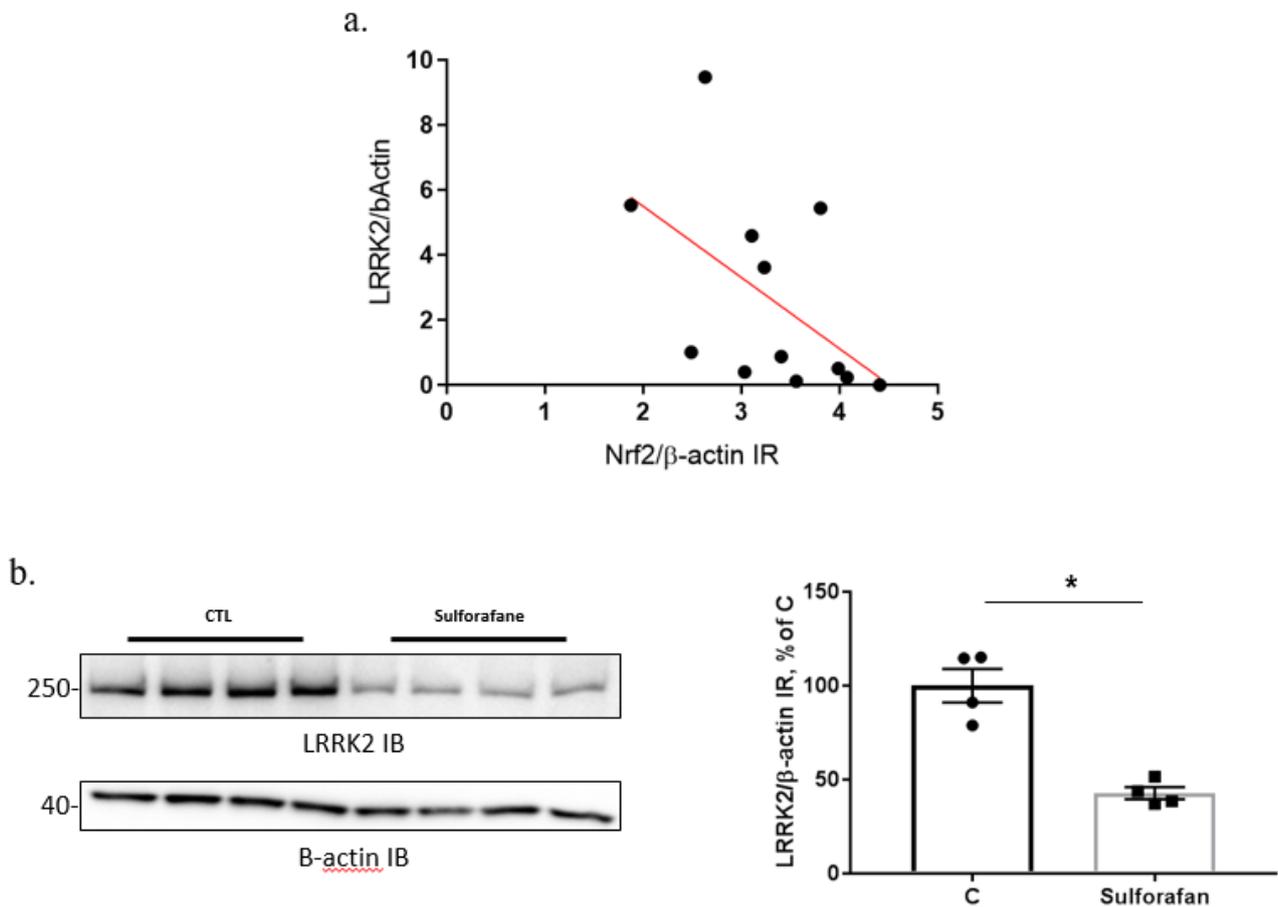


Figure 13 : Nrf2 et LRRK2 dans les biopsies de patients et dans la culture de SNE. a. Corrélation des résultats de WB pour LRRK2 (issus de l'article 1) et Nrf2 (issus de Prigent *et al.* (187)) dans les biopsies de patients porteurs d'une MC de l'article 1 ($r = - 0,67$, $p < 0,05$), **b.** Quantification de Lrrk2 en WB suite au traitement ou non de la culture primaire de SNE (voir article 2) par 12h de sulforafane ($n = 4$ pour les deux conditions ; $p < 0,05$ avec un test de Mann Whitney)

On ne peut pas non plus complètement **exclure** que l'**augmentation** du signal **LRRK2** dans les biopsies des patients porteurs d'une MC soit le reflet d'une augmentation de son expression dans les **ganglions** sous-muqueux, d'autant que des atteintes morphologiques du SNE sont documentées dans la MC (119). Là encore, nos données préliminaires montrent que le traitement des cultures primaires de SNE par INF- γ , et pas par TNF- α , induit l'augmentation d'expression de Lrrk2 (voir figure 14) suggérant un mécanisme de régulation dans le SNE équivalent à celui décrit dans la lignée monocyttaire THP-1 (voir chapitre II-4.c). Que cette régulation se déroule dans les neurones et/ou dans les CGE reste à explorer ; là encore, cette augmentation de Lrrk2 pourrait avoir lieu dans les CGE du fait d'une l'inhibition de la voie AMPc par l'INF- γ (186). Cette hypothèse soulève en tous cas la question d'une surexpression de LRRK2 dans le SNE des patients porteurs d'une MC (voir figure 15c) ; une façon d'y répondre serait de **quantifier LRRK2** en immunofluorescence **dans les ganglions** myentériques et sous-muqueux de pièces opératoires des sujets atteints de MC, à l'image de ce que nous avons fait pour la MP dans l'article 2.

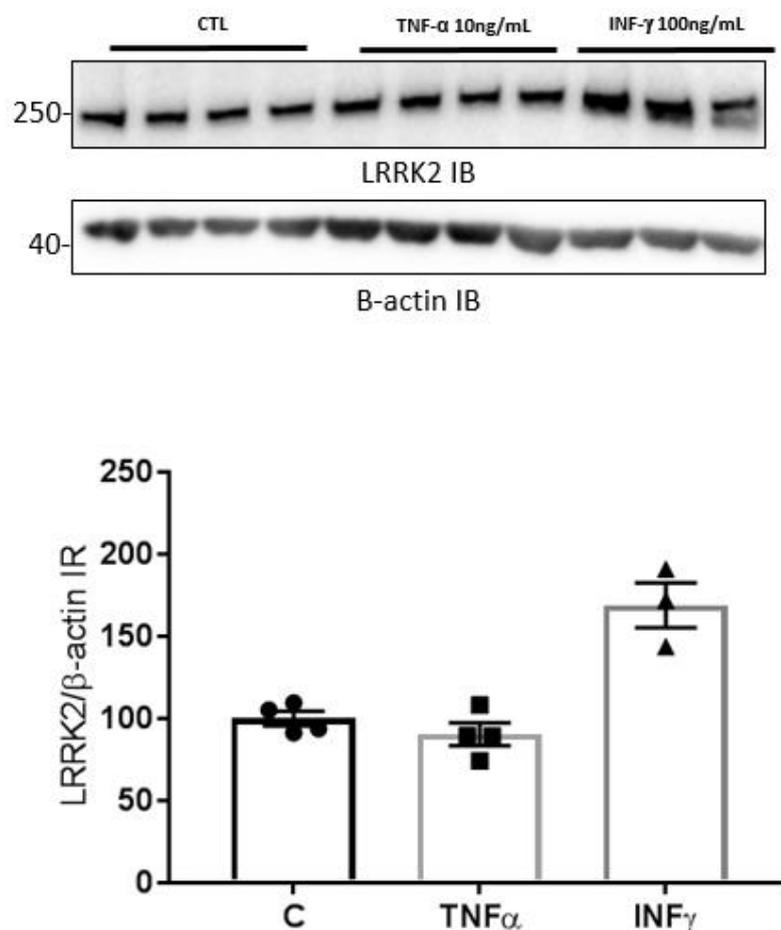


Figure 14 : Lrrk2 dans la culture de SNE traitée par cytokines pro-inflammatoires. Quantification de Lrrk2 en WB suite au traitement ou non de la culture primaire de SNE (voir article 2) par 72h de TNF- α (10ng/mL) ou INF- γ (100ng/mL). n = 4 pour les non traités (CTL), 4 pour les TNF- α et 3 pour les INF- γ .

Enfin, il reste une **question importante** à traiter : LRRK2 est-elle impliquée uniquement dans la zone et au moment correspondants à la poussée inflammatoire ? Ou existe-t-il une **dérégulation de LRRK2** dans la MC **en dehors des poussées** ? Pour répondre à cette question, les mêmes travaux réalisés sur les zones inflammatoires devraient être réalisés sur les zones saines du tube digestif de patients porteurs de MC, en comparaison de sujets témoins.

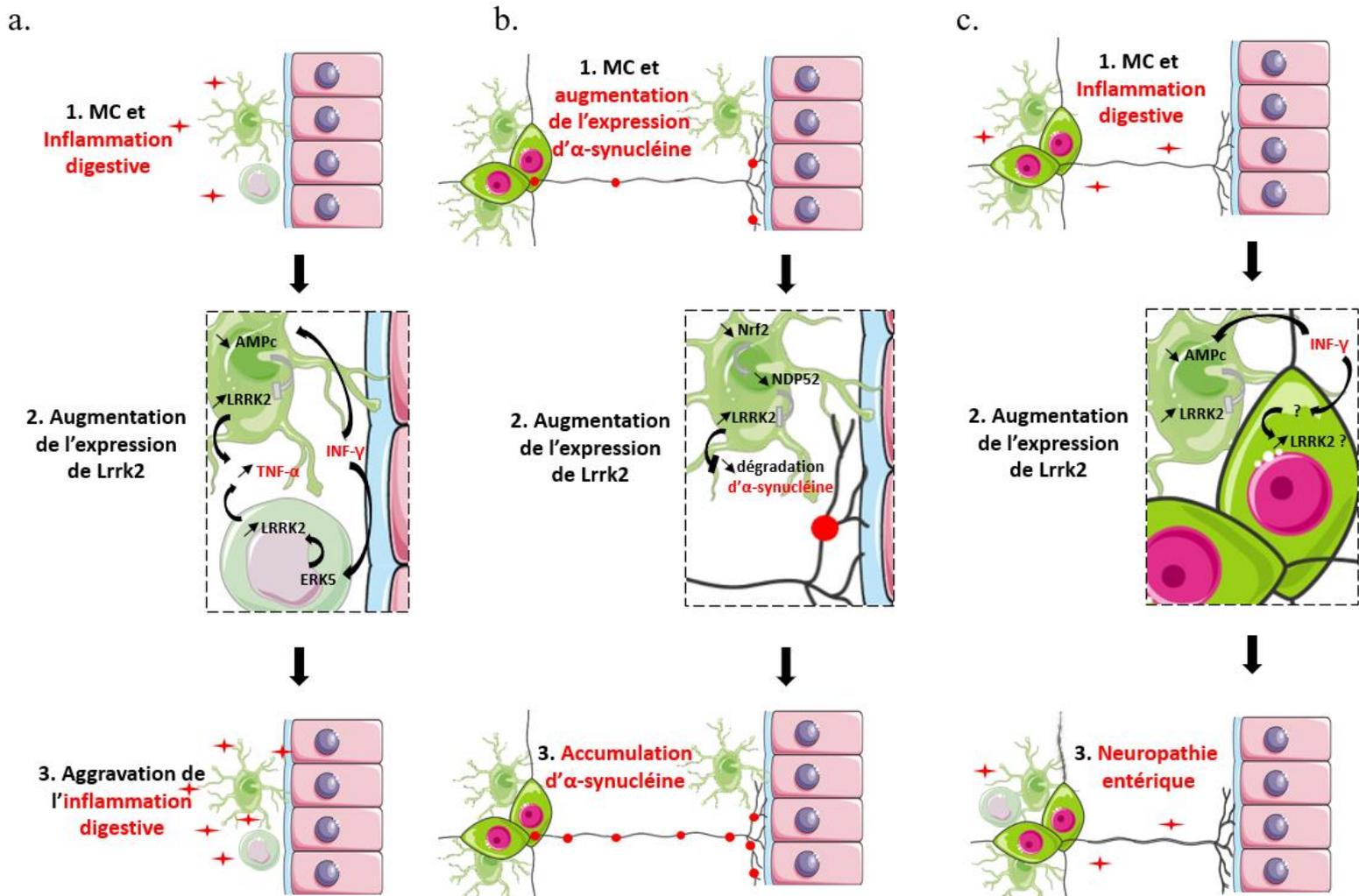


Figure 15 : Hypothèses sur l'augmentation de LRRK2 entérique dans la MC. **a.** L'inflammation digestive de la MC génère de l'INF- γ qui augmente l'expression de LRRK2 dans les cellules immunitaires de la *lamina propria* (voie ERK5) et dans les CGE muqueuses (voie AMPc) ce qui augmente la synthèse de TNF- α et aggrave l'inflammation. **b.** La baisse d'expression de Nrf2 et de son effecteur NDP52 induit une augmentation de l'expression de LRRK2 dans les CGE muqueuses ce qui altère leur capacité à éliminer l' α -synucléine. **c.** L'inflammation digestive de la MC génère de l'INF- γ qui augmente l'expression de LRRK2 dans les CGE ganglionnaires (voie AMPc) et/ou dans les neurones entériques (voie inconnue) ce qui est responsable d'une neuropathie entérique marquée par des altérations hypertrophiques et rétractiles des fibres nerveuses et une infiltration immunitaire des ganglions(119). Illustrations tirées de Servier Smart Art.

4. AMPc, PKA et Lrrk2

La mise en évidence dans l'article 2 d'une **régulation transcriptionnelle de *Lrrk2*** dans les cultures de **CGE** par la **voie AMPc** rajoute une nouvelle strate de complexité dans la relation bidirectionnelle Lrrk2/voie AMPc. En effet, le principal effecteur de la voie AMPc, la PKA (183), phosphoryle directement LRRK2 et régule ses phosphatases dans différents types cellulaires (voir chapitre II-4.c) ; en parallèle, LRRK2 régule négativement la PKA dans les neurones efférents du striatum, en modifiant sa localisation subcellulaire (188), et dans la microglie en régulant l'activité de la phosphodiesterase de type 4 (189). Cette régulation transcriptionnelle de *Lrrk2* par la voie AMPc semble **dépendante du type cellulaire** puisque des résultats opposés sont obtenus entre les cultures de neurones et de CGE. Notre résultat expérimental est d'autant plus crédible qu'il existe au moins un exemple documenté de différences d'expression d'effecteurs de la voie AMPc entre neurones et glie qui résulte en des effets inverses d'un même stimulus (190).

La discussion de l'article 2 compare nos résultats dans les cultures de CGE avec la littérature existante sur la régulation de la phosphorylation de Lrrk2 par la PKA (voir chapitre II-4.c) et conclue qu'elle est probablement dépendante du type cellulaire. Une revue récente (191) donne des exemples concrets de mécanismes moléculaires par lesquels l'**AMPc régule** les deux protéines phosphatases identifiées comme régulant la phosphorylation de LRRK2 en S935, à savoir PP1 et **PP2A** (voir chapitre II-4.c). Quand nous observons une **diminution de la phosphorylation en S935** sous stimulation de la voie AMPc (forskoline ou analogue de l'AMPc, voir Article 2, figure 8), cela est possiblement en lien avec une activation de PP2A par la PKA (voir figure 16b). En effet, si l'effet de la PKA sur la PP1 est plutôt décrit comme inhibiteur, celle-ci peut activer la PP2A soit directement (phosphorylation de sa sous-unité régulatrice), soit indirectement (certains inhibiteurs de la PP2A sont inactifs quand phosphorylés par la PKA) (191). Bien sûr d'autres mécanismes indirectes non décrits dans la littérature pourraient être en jeu tels qu'une inactivation des kinases de LRRK2 (par exemple la CK1 α) ou une diminution de l'affinité de LRRK2 pour la protéine 14-3-3 (l'interaction LRRK2/14-3-3 protégeant de la déphosphorylation en S935 (192)). Lorsque l'on évalue l'effet de cette déphosphorylation en S935 sur l'activité kinase de Lrrk2 (via Rab10), on observe une légère diminution de la phosphorylation en T73 après stimulation à la forskoline (voir Article 2, supplementary figure 4). Ce résultat va dans le sens des données générées par Ito *et al.* qui montrent que des fibroblastes de souris KI pour Lrrk2 S910A/S935A (formes non phosphorylables de Lrrk2 en S910 et S935) présentent une nette baisse de la phosphorylation de Rab10 en T73 (46) ; l'ensemble de ces données pourrait être expliqué par une **diminution de la capacité de Lrrk2 à interagir avec**

la protéine **14-3-3** (voir chapitre II-4.c) qui modifie sa localisation subcellulaire et ainsi sa capacité à accéder à son substrat **Rab10**(46) (voir figure 16).

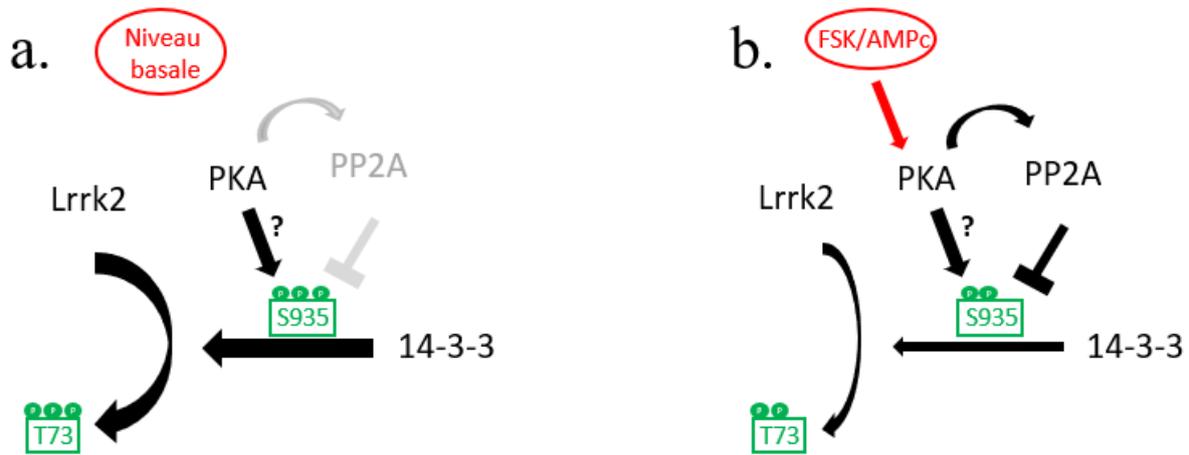


Figure 16 : Hypothèses sur la régulation de la phosphorylation de S935 par la PKA dans nos cultures de CGE. a. Au niveau basal, la PKA est possiblement l'une des kinases responsables de la phosphorylation de Lrrk2 en S935. L'activation de la PP2A est faible dans cet état. Lrrk2 est très associée à la protéine 14-3-3 et accède facilement à son substrat Rab10. **b.** L'activation de la voie AMPc induit la régulation positive de l'activité de la PP2A envers Lrrk2 par la PKA. S935 est déphosphorylée car la phosphorylation directe de Lrrk2 par la PKA est déjà maximale au niveau basal, ou n'a pas lieu dans ce modèle. L'affinité de Lrrk2 pour la 14-3-3 est moindre ce qui limite son accès à Rab10.

5. Conclusion

Mes trois ans de thèse auront permis de **générer des hypothèses sur le rôle de LRRK2 entérique dans la MP** à partir de données humaines originales. En perspective, il me semble important de **préciser** l'éventuel rôle pathologique de LRRK2 dans le SNE des sujets atteints de MP en évaluant l'**activité kinase de LRRK2 spécifiquement dans les ganglions** du SNE ; la méthode de « proximity ligation assay » sur prélèvements *post-mortem*, qui a permis à Di Maio *et al.* d'évaluer la phosphorylation de Rab10 en T73 dans la substance noire des sujets parkinsoniens (79) et qui a récemment fait l'objet d'un article de méthode (47) devrait permettre une telle évaluation. Enfin, la mise en évidence d'un nouvel aspect de la relation bidirectionnelle complexe entre la voie AMPc et Lrrk2 sera peut-être une pierre portée à l'édifice de la compréhension du rôle cellulaire de LRRK2.

Bibliographie

1. Lees A. An essay on the shaking palsy. *Brain*. 2017 Mar 1;140(3):843–8.
2. Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(6):745–52.
3. Postuma RB, Poewe W, Litvan I, Lewis S, Lang AE, Halliday G, et al. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2018 Oct 1;33(10):1601–8.
4. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*. 2006 Mar;5(3):235–45.
5. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW, et al. The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology*. 2000 Dec 12;55(11 Suppl 4).
6. Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's Disease: Non-L-Dopa-Responsive Problems Dominate at 15 Years. 2004;
7. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006 Jun 1;5(6):525–35.
8. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2021;397(10291):2284–303.
9. Parent M, Parent A. Substantia nigra and Parkinson's Disease: A Brief History of Their Long and Intimate Relationship. *THE CANADIAN JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES*. 2010;37:313–9.
10. Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord*. 2008 Apr 30;23(6):777–83.
11. Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism Relat Disord*. 1998 Aug 1;4(2):53–7.
12. Hornykiewicz O. L-DOPA. *J Parkinsons Dis*. 2017;7(s1):S3–10.
13. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* (1979). 1997;276(5321):2045–7.
14. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839–40.
15. Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Seilhean D, Hauw JJ, Duyckaerts C. A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol Aging*. 2010 Jan 1;31(1):99–103.
16. Horvath J, Herrmann FR, Burkhard PR, Bouras C, Kövari E. Neuropathology of dementia in a large cohort of patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013 Oct;19(10):864–8.
17. Hu MT. REM sleep behavior disorder (RBD). *Neurobiol Dis*. 2020 Sep 1;143:104996.
18. Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in lewy body disorders. *Movement Disorders*. 2014;29(8):1010–8.
19. Knudsen K, Borghammer P. Imaging the Autonomic Nervous System in Parkinson's Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018 Nov 1;18(11).
20. Rouaud T, Corbillé AG, Leclair-Visonneau L, de Guilhem de Lataillade A, Lionnet A, Preterre C, et al. Pathophysiology of Parkinson's disease: Mitochondria, alpha-synuclein and much more.... *Rev Neurol (Paris)*. 2021 Mar 1;177(3):260–71.
21. Hawkes CH, del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. Vol. 33, *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2007. p. 599–614.
22. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Vol. 318, *Cell and Tissue Research*. 2004. p. 121–34.

23. Lionnet A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Murayama S, Takao M, Adler CH, et al. Does Parkinson's disease start in the gut? Vol. 135, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2018.
24. Borghammer P, van den Berge N. Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. Vol. 9, *Journal of Parkinson's Disease*. IOS Press; 2019. p. S281–95.
25. Horsager J, Andersen KB, Knudsen K, Skjærbæk C, Fedorova TD, Okkels N, et al. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain*. 2020 Oct 1;143(10):3077–88.
26. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009 Apr;8(4):382–97.
27. Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 1;21(7).
28. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol*. 2002;51(3):296–301.
29. Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, Van Der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):595–600.
30. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):601–7.
31. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912–34.
32. Galter D, Westerlund M. LRRK2 Expression Linked to Dopamine-Innervated Areas. 2006;59(4):1821–4.
33. Miklossy J, Arai T, Guo JP, Klegeris A, Yu S, McGeer EG, et al. LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Oct;65(10):953–63.
34. Lee H, Melrose HL, Yu M, Pare JF, Farrer MJ, Smith Y, et al. Lrrk2 Localization in the Primate Basal ganglia and Thalamus: A Light and Electron Microscopic Analysis in Monkeys. *Exp Neurol*. 2010;224(2):438–47.
35. Giesert F, Hofmann A, Bürger A, Zerle J, Kloos K, Hafen U, et al. Expression analysis of Lrrk1, Lrrk2 and Lrrk2 splice variants in mice. *PLoS One*. 2013 May 10;8(5).
36. West AB, Cowell RM, Daher JPL, Moehle MS, Hinkle KM, Melrose HL, et al. Differential LRRK2 expression in the cortex, striatum, and substantia nigra in transgenic and nontransgenic rodents. *J Comp Neurol*. 2014 Aug 1;522(11):2465–80.
37. Myasnikov A, Zhu H, Hixson P, Xie B, Yu K, Pitre A, et al. Structural analysis of the full-length human LRRK2. *Cell*. 2021 Jun 24;184(13):3519–3527.e10.
38. Bonet-Ponce L, Cookson MR. LRRK2 recruitment, activity, and function in organelles. *FEBS J*. 2021;
39. Civiero L, Cogo S, Biossa A, Greggio E. The role of LRRK2 in cytoskeletal dynamics. *Biochem Soc Trans*. 2018 Nov 22;46(6):1653–63.
40. Singh A, Zhi L, Zhang H. LRRK2 and mitochondria: Recent advances and current views. *Brain Res*. 2019 Jan 1;1702:96–104.
41. Ahmadi Rastegar D, Dzamko N. Leucine Rich Repeat Kinase 2 and Innate Immunity. *Front Neurosci*. 2020 Mar 10;14.
42. Price A, Manzoni C, Cookson MR, Lewis PA. The LRRK2 signalling system. *Cell Tissue Res*. 2018;373(1):39–50.
43. Deshpande P, Flinkman D, Hong Y, Goltseva E, Siino V, Sun L, et al. Protein synthesis is suppressed in sporadic and familial Parkinson's disease by LRRK2. *FASEB J*. 2020 Nov 1;34(11):14217–33.
44. Steger M, Tonelli F, Ito G, Davies P, Trost M, Vetter M, et al. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife*. 2016 Jan 29;5.

45. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Aug;10(8):513–25.
46. Ito G, Katsemonova K, Tonelli F, Lis P, Baptista MAS, Shpiro N, et al. Phos-tag analysis of Rab10 phosphorylation by LRRK2: a powerful assay for assessing kinase function and inhibitors. *Biochem J.* 2016;473(17):2671–85.
47. Keeney MT, Hoffman EK, Greenamyre JT, Di Maio R. Measurement of LRRK2 Kinase Activity by Proximity Ligation Assay. *Bio Protoc.* 2021 Sep 5;11(17).
48. Seol W, Nam D, Son I. Rab GTPases as Physiological Substrates of LRRK2 Kinase. *Exp Neurobiol.* 2019 Apr 1;28(2):134–45.
49. Gao Y, Wilson GR, Stephenson SEM, Bozaoglu K, Farrer MJ, Lockhart PJ. The emerging role of Rab GTPases in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Mov Disord.* 2018 Feb 1;33(2):196–207.
50. Marchand A, Drouyer M, Sarchione A, Chartier-Harlin MC, Taymans JM. LRRK2 Phosphorylation, More Than an Epiphenomenon. *Front Neurosci* [Internet]. 2020 Jun 16 [cited 2022 Jul 27];14. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/32612495/>
51. Ito G, Okai T, Fujino G, Takeda K, Ichijo H, Katada T, et al. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson’s disease. *Biochemistry.* 2007 Feb 6;46(5):1380–8.
52. Li X, Wang QJ, Pan N, Lee S, Zhao Y, Chait BT, et al. Phosphorylation-dependent 14-3-3 binding to LRRK2 is impaired by common mutations of familial Parkinson’s disease. *PLoS One.* 2011;6(3).
53. Muda K, Bertinetti D, Gesellchen F, Hermann JS, Von Zweyendorf F, Geerloff A, et al. Parkinson-related LRRK2 mutation R1441C/G/H impairs PKA phosphorylation of LRRK2 and disrupts its interaction with 14-3-3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(1).
54. Reynolds A, Doggett EA, Riddle SM, Lebakken CS, Jeremy Nichols R. LRRK2 kinase activity and biology are not uniformly predicted by its autophosphorylation and cellular phosphorylation site status. *Front Mol Neurosci.* 2014 Jun 24;7(JUNE).
55. Chia R, Haddock S, Beilina A, Rudenko IN, Mamais A, Kaganovich A, et al. Phosphorylation of LRRK2 by casein kinase 1 α regulates trans-Golgi clustering via differential interaction with ARHGEF7. *Nat Commun.* 2014;5.
56. Dzamko N, Inesta-Vaquera F, Zhang J, Xie C, Cai H, Arthur S, et al. The IkappaB kinase family phosphorylates the Parkinson’s disease kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-Like Receptor signaling. *PLoS One.* 2012 Jun 18;7(6).
57. Lobbetael E, Zhao J, Rudenko IN, Beylina A, Gao F, Wetter J, et al. Identification of protein phosphatase 1 as a regulator of the LRRK2 phosphorylation cycle. *Biochem J.* 2013 Nov 15;456(1):119–28.
58. Drouyer M, Bolliger MF, Lobbetael E, Van den Haute C, Emanuele M, Lefebvre R, et al. Protein phosphatase 2A holoenzymes regulate leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylation and accumulation. *Neurobiol Dis.* 2021 Sep 1;157.
59. Civiero L, Russo I, Bubacco L, Greggio E. Molecular Insights and Functional Implication of LRRK2 Dimerization. *Adv Neurobiol.* 2017 Apr 1;14:107–21.
60. Gardet A, Benita Y, Li C, Sands BE, Ballester I, Stevens C, et al. LRRK2 Is Involved in the IFN- γ Response and Host Response to Pathogens. *The Journal of Immunology.* 2010;185(9):5577–85.
61. Kuss M, Adamopoulou E, Kahle PJ. Interferon- γ induces leucine-rich repeat kinase LRRK2 via extracellular signal-regulated kinase ERK5 in macrophages. *J Neurochem.* 2014;129(6):980–7.
62. Wang J, Song W. Regulation of LRRK2 promoter activity and gene expression by Sp1. *Mol Brain.* 2016;1–13.
63. Yan X, Li M, Luo Z, Zhao Y, Zhang H, Chen L. VIP Induces Changes in the F-/G-Actin Ratio of Schlemm’s Canal Endothelium via LRRK2 Transcriptional Regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020 Jun 1;61(6).

64. Cho HJ, Liu G, Jin SM, Parisiadou L, Xie C, Yu J, et al. MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein. *Hum Mol Genet.* 2013 Feb;22(3):608–20.
65. Wu Q, Xi DZ, Wang YH. MicroRNA-599 regulates the development of Parkinson's disease through mediating LRRK2 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(2):724–31.
66. Oliveira SR, Dionísio PA, Gaspar MM, Correia Guedes L, Coelho M, Rosa MM, et al. miR-335 Targets LRRK2 and Mitigates Inflammation in Parkinson's Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun 15;9.
67. Wang L, Xie C, Greggio E, Parisiadou L, Shim H, Sun L, et al. The Chaperone Activity of Heat Shock Protein 90 Is Critical for Maintaining the Stability of Leucine-Rich Repeat Kinase 2. *2019;28(13):3384–91.*
68. Ko HS, Bailey R, Smith WW, Liu Z, Shin JH, Lee Y Il, et al. CHIP regulates leucine-rich repeat kinase-2 ubiquitination, degradation, and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 24;106(8):2897–902.
69. Ding X, Goldberg MS. Regulation of LRRK2 Stability by the E3 Ubiquitin Ligase. *2009;4(6).*
70. Ding X, Barodia SK, Ma L, Goldberg MS. Fbx118 targets LRRK2 for proteasomal degradation and attenuates cell toxicity. *Neurobiol Dis.* 2017 Feb 1;98:122–36.
71. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci.* 2013 Apr;16(4):394–406.
72. Monfrini E, Di Fonzo A. Leucine-Rich Repeat Kinase (LRRK2) Genetics and Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol.* 2017 Apr 1;14:3–30.
73. Schmidt SH, Knape MJ, Boassa D, Mumdey N, Kornev AP, Ellisman MH, et al. The dynamic switch mechanism that leads to activation of LRRK2 is embedded in the DFG ψ motif in the kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(30):14979–88.
74. Lewis PA, Greggio E, Beilina A, Jain S, Baker A, Cookson MR. The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 8;357(3):668–71.
75. Daniëls V, Vancraenenbroeck R, Law BMH, Greggio E, Lobbstaël E, Gao F, et al. Insight into the mode of action of the LRRK2 Y1699C pathogenic mutant. *J Neurochem.* 2011 Jan;116(2):304–15.
76. Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener.* 2019 Dec 21;14(1).
77. Whiffin N, Armean IM, Kleinman A, Marshall JL, Minikel E V., Goodrich JK, et al. The effect of LRRK2 loss-of-function variants in humans. *Nat Med.* 2020 Jun 1;26(6):869–77.
78. Seegobin SP, Heaton GR, Liang D, Choi I, Blanca Ramirez M, Tang B, et al. Progress in LRRK2-Associated Parkinson's Disease Animal Models. *Front Neurosci.* 2020 Jul 15;14.
79. Maio R Di, Hoffman EK, Rocha EM, Keeney MT, Sanders LH, De Miranda BR, et al. A Central Role for LRRK2 in Idiopathic Parkinson Disease HHS Public Access. *Sci Transl Med.* 2018;10(451).
80. Daher JPL, Abdelmotilib HA, Hu X, Volpicelli-Daley LA, Moehle MS, Fraser KB, et al. Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates α -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J Biol Chem.* 2015 Aug 7;290(32):19433–44.
81. Lewis PA. A step forward for LRRK2 inhibitors in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2022 Jun 8;14(648).
82. Dzamko N, Gysbers AM, Bandopadhyay R, Bolliger MF, Uchino A, Zhao Y, et al. LRRK2 levels and phosphorylation in Parkinson's disease brain and cases with restricted Lewy bodies. *Movement Disorders.* 2017;32(3):423–32.
83. Filippini A, Gennarelli M, Russo I. Leucine-rich repeat kinase 2-related functions in GLIA: an update of the last years. *Biochem Soc Trans.* 2021 Jun 1;49(3):1375–84.
84. Verbaan D, Marinus J, Visser M, Van Rooden SM, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology.* 2007 Jul;69(4):333–41.

85. Fasano A, Visanji NP, Liu LWC, Lang AE, Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2015 Jun 1;14(6):625–39.
86. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 May;9(5):286–94.
87. Michel K, Kuch B, Dengler S, Demir IE, Zeller F, Schemann M. How big is the little brain in the gut? Neuronal numbers in the enteric nervous system of mice, Guinea pig, and human. *Neurogastroenterol Motil.* 2022 Aug 5;
88. Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology.* 2007;69(20):1953–7.
89. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Derkinderen P. Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease? *Mov Disord.* 2015 Apr 1;30(4):494–8.
90. Hoff S, Zeller F, Von Weyhern CWH, Wegner M, Schemann M, Michel K, et al. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol.* 2008 Aug 1;509(4):356–71.
91. Seguela L, Gulbransen BD. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021 Aug 1;18(8):571–87.
92. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Derkinderen P. Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease? *Mov Disord.* 2015 Apr 1;30(4):494–8.
93. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2013;50(1):42–8.
94. Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2014 Sep 1;130(6):805–15.
95. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Des Varannes SB, Neunlist M, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Jan;22(1).
96. Pabois J, Durand T, Le Berre C, Gonzales J, Neunlist M, Bourreille A, et al. T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients. *J Neuroimmunol.* 2020 Dec 15;349.
97. van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, et al. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(6).
98. Soret R, Coquenlorge S, Cossais F, Meurette G, Rolli-Derkinderen M, Neunlist M. Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25(11):e755–64.
99. Bannerman PGC, Mirsky R, Jessen KR. Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia. *Brain Res.* 1988 Feb 2;440(1):99–108.
100. D'Errico F, Goverse G, Dai Y, Wu W, Stakenborg M, Labeeuw E, et al. Estrogen receptor β controls proliferation of enteric glia and differentiation of neurons in the myenteric plexus after damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 May 29;115(22):5798–803.
101. Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology.* 1984;87(4):848–56.
102. de Lataillade A de G, Lebouvier T, Noble W, Leclair-Visonneau L, Derkinderen P. Enteric synucleinopathy: real entity or only a trendy concept? *Free Neuropathol.* 2020 Aug 28;1:26–26.
103. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue LF, White CL, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010;119(6):689–702.

104. Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, De Laat R, Banducci K, Caccavello RJ, et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem*. 2006 Oct 6;281(40):29739–52.
105. Fairfoul G, McGuire LI, Pal S, Ironside JW, Neumann J, Christie S, et al. Alpha-synuclein RT-QuIC in the CSF of patients with alpha-synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016;3(10):812–8.
106. Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol*. 2014;75(3):351–62.
107. Lataillade ADG De, Lebouvier T, Noble W, Leclair-visonneau L. Enteric synucleinopathy : from trendy concept to real entity . 2020;26:1–9.
108. Fenyi A, Leclair-Visonneau L, Clairembault T, Coron E, Neunlist M, Melki R, et al. Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification. *Neurobiol Dis*. 2019 Sep 1;129:38–43.
109. Recasens A, Carballo-Carbajal I, Parent A, Bové J, Gelpi E, Tolosa E, et al. Lack of pathogenic potential of peripheral α -synuclein aggregates from Parkinson’s disease patients. *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Feb 23;6(1).
110. Killinger BA, Madaj Z, Sikora JW, Rey N, Haas AJ, Vepa Y, et al. The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson’s disease. *Sci Transl Med*. 2018 Oct 31;10(465).
111. Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, Greene JG. Parkinson’s disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol*. 2012 Nov;124(5):665–80.
112. Lebouvier T, Neunlist M, des Varannes SB, Coron E, Drouard A, N’Guyen JM, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson’s disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*. 2010;5(9):1–9.
113. Giancola F, Torresan F, Repossì R, Bianco F, Latorre R, Ioannou A, et al. Downregulation of neuronal vasoactive intestinal polypeptide in Parkinson’s disease and chronic constipation. *Neurogastroenterol Motil*. 2017 May 1;29(5).
114. Rolli-Derkinderen M, Leclair-Visonneau L, Bourreille A, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P. Is Parkinson’s disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J Neurol*. 2019;
115. Fedorova TD, Seidelin LB, Knudsen K, Schacht AC, Geday J, Pavese N, et al. Decreased intestinal acetylcholinesterase in early Parkinson disease: An 11 C-donepezil PET study. *Neurology*. 2017 Feb 21;88(8):775–81.
116. Bihari K, Lees AJ. Cigarette smoking, Parkinson’s disease and ulcerative colitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1987;50(5):635.
117. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn’s disease. *Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1741–55.
118. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1756–70.
119. Holland AM, Bon-Frauches AC, Keszthelyi D, Melotte V, Boesmans W. The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. *Cell Mol Life Sci*. 2021 May 1;78(10):4713–33.
120. Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Juzwiak S, Kurzawski G, et al. CARD15 variants in patients with sporadic Parkinson’s disease. *Neurosci Res*. 2007 Mar;57(3):473–6.
121. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn’s disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955–62.
122. Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, et al. Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Dec;17(12):2407–15.

123. Ken Y. Hui, Heriberto Fernandez-Hernandez, Jianzhong Hu, Adam Schaffner, Nathan Pankratz, Nai-Yun Hsu, Ling-Shiang Chuang, Shai Carmi, Nicole Villaverde, Xianting Li, Manual Rivas, Adam P. Levine, Xiuliang Bao, Philippe R. Labrias, Talin Haritunians, Darr and IP. Functional Variants in LRRK2 Confer Pleiotropic Effects on Risk for Crohn's Disease and Parkinson's Disease. *Sci Transl Med.* 2016;42(2):407–20.
124. Zhu F, Li C, Gong J, Zhu W, Gu L, Li N. The risk of Parkinson's disease in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Dig Liver Dis.* 2019 Jan 1;51(1):38–42.
125. Peter I, Dubinsky M, Bressman S, Park A, Lu C, Chen N, et al. Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. *JAMA Neurol.* 2018 Aug 1;75(8):939–46.
126. Prigent A, Lionnet A, Durieu E, Chapelet G, Bourreille A, Neunlist M, et al. Enteric alpha-synuclein expression is increased in Crohn's disease. *Acta Neuropathol.* 2019;137(2):359–61.
127. Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, Forsyth CB, Huschens AM, Shaikh M, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut.* 2019;68(5):829–43.
128. Pochard C, Leclair-Visonneau L, Coron E, Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Derkinderen P. Cyclooxygenase 2 is upregulated in the gastrointestinal tract in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2018 Mar 1;33(3):493–4.
129. Houser MC, Chang J, Factor SA, Molho ES, Zabetian CP, Hill-Burns EM, et al. Stool Immune Profiles Evince Gastrointestinal Inflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2018 May 1;33(5):793–804.
130. Schwiertz A, Spiegel J, Dillmann U, Grundmann D, Bürmann J, Faßbender K, et al. Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018 May 1;50:104–7.
131. Dumitrescu L, Marta D, Dănaŭ A, Lefter A, Tulbă D, Cozma L, et al. Serum and Fecal Markers of Intestinal Inflammation and Intestinal Barrier Permeability Are Elevated in Parkinson's Disease. *Front Neurosci.* 2021 Jun 18;15.
132. Kline EM, Houser MC, Herrick MK, Seibler P, Klein C, West A, et al. Genetic and Environmental Factors in Parkinson's Disease Converge on Immune Function and Inflammation. *Mov Disord.* 2021 Jan 1;36(1):25–36.
133. Van Ijzendoorn SCD, Derkinderen P. The Intestinal Barrier in Parkinson's Disease: Current State of Knowledge. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(s2):S323–9.
134. Yemula N, Dietrich C, Dostal V, Hornberger M. Parkinson's Disease and the Gut: Symptoms, Nutrition, and Microbiota. *J Parkinsons Dis.* 2021;11(4):1491–505.
135. Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One.* 2010 Jan 19;5(1).
136. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol.* 2014;128(6):805–20.
137. Arotcarena ML, Dovero S, Prigent A, Bourdenx M, Camus S, Porras G, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain.* 2020 May 1;143(5):1462–75.
138. Prigent A, Gonzales J, Durand T, Le Berre-Scoul C, Rolli-Derkinderen M, Neunlist M, et al. Acute inflammation down-regulates alpha-synuclein expression in enteric neurons. *J Neurochem.* 2019;148(6):746–60.
139. Garrido-Gil P, Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Mejide A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Bidirectional Neural Interaction Between Central Dopaminergic and Gut Lesions in Parkinson's Disease Models. *Mol Neurobiol.* 2018 Sep 1;55(9):7297–316.
140. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic B V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018 Mar 1;14(3):133–50.
141. Godoy MCP, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain.* 2008;131(Pt 7):1880–94.

142. Villarán RF, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, De Pablos RM, Argüelles S, Delgado-Cortés MJ, et al. Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: potential risk factor in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2010;114(6):1687–700.
143. Zheng LF, Wang ZY, Li XF, Song J, Hong F, Lian H, et al. Reduced expression of choline acetyltransferase in vagal motoneurons and gastric motor dysfunction in a 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2011 Oct 28;1420:59–67.
144. Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2014;384(9957):1878–88.
145. Zhang YM, Zhou XJ, Cheng FJ, Qi YY, Hou P, Zhao MH, et al. Autophagy-related gene LRRK2 is likely a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus in northern Han Chinese. *Oncotarget.* 2017;8(8):13754–61.
146. Zhang M, Yao C, Cai J, Liu S, Liu XN, Chen Y, et al. LRRK2 is involved in the pathogenesis of system lupus erythematosus through promoting pathogenic antibody production. *J Transl Med.* 2019 Jan 22;17(1).
147. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209–19.
148. Fava VM, Manry J, Cobat A, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. A Missense LRRK2 Variant Is a Risk Factor for Excessive Inflammatory Responses in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Feb 4;10(2).
149. Fava VM, Xu YZ, Lettre G, Thuc N Van, Orlova M, Thai VH, et al. Pleiotropic effects for Parkin and LRRK2 in leprosy type-1 reactions and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jul 30;116(31):15616–24.
150. Lebovitz CB, Robertson AG, Goya R, Jones SJ, Morin RD, Marra MA, et al. Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy.* 2015;11(9):1668–87.
151. Lebovitz C, Wretham N, Osooly M, Milne K, Dash T, Thornton S, et al. Loss of Parkinson's susceptibility gene LRRK2 promotes carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Sci Rep.* 2021 Dec 1;11(1).
152. Qi L, Gao C, Feng F, Zhang T, Yao Y, Wang X, et al. MicroRNAs associated with lung squamous cell carcinoma: New prognostic biomarkers and therapeutic targets. *J Cell Biochem.* 2019 Nov 1;120(11):18956–66.
153. Cheung M, Kadariya Y, Sementino E, Hall MJ, Cozzi I, Ascoli V, et al. Novel LRRK2 mutations and other rare, non-BAP1-related candidate tumor predisposition gene variants in high-risk cancer families with mesothelioma and other tumors. *Hum Mol Genet.* 2021 Sep 15;30(18):1750–61.
154. Gu S, Chen J, Zhou Q, Yan M, He J, Han X, et al. LRRK2 Is Associated with Recurrence-Free Survival in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Downregulation of LRRK2 Suppresses Tumor Progress In Vitro. *Dig Dis Sci.* 2020 Feb 1;65(2):500–8.
155. Yang C, Pang J, Xu J, Pan H, Li Y, Zhang H, et al. LRRK2 is a candidate prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2021 Dec 1;21(1).
156. Hasegawa K, Stoessl AJ, Yokoyama T, Kowa H, Wszolek ZK, Yagishita S. Familial parkinsonism: study of original Sagami-hara PARK8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 May;15(4):300–6.
157. Kestenbaum M, Alcalay RN. Clinical Features of LRRK2 Carriers with Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol.* 2017 Apr 1;14:31–48.
158. Schneider SA, Alcalay RN. Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. *Mov Disord.* 2017 Nov 1;32(11):1504–23.
159. Martí-Massó JF, Ruiz-Martínez J, Bolaño MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F, et al. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. *Mov Disord.* 2009 Oct 15;24(13):1998–2001.
160. Takahashi M, Funayama M, Matsuura E, Yoshino H, Li Y, Tsuyama S, et al. Isolated nigral degeneration without pathological protein aggregation in autopsied brains with LRRK2 p.R1441H homozygous and heterozygous mutations. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Oct 17;6(1):105.
161. Zhang Q, Pan Y, Yan R, Zeng B, Wang H, Zhang X, et al. Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis. *Nat Immunol.* 2015 Aug 19;16(9):918–26.

162. Maekawa T, Shimayama H, Tsushima H, Kawakami F, Kawashima R, Kubo M, et al. LRRK2: An Emerging New Molecule in the Enteric Neuronal System That Quantitatively Regulates Neuronal Peptides and IgA in the Gut. *Dig Dis Sci.* 2017;62(4):903–12.
163. Drokhlyansky E, Smillie CS, Van Wittenberghe N, Ericsson M, Griffin GK, Eraslan G, et al. The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell.* 2020 Sep 17;182(6):1606-1622.e23.
164. Takagawa T, Kitani A, Fuss I, Levine B, Brant SR, Peter I, et al. An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances Dectin-1-induced immunity in a mouse model of colitis. *Sci Transl Med.* 2018 Jun 6;10(444).
165. Sharifinejad N, Mozhgani SH, Bakhtiyari M, Mahmoudi E. Association of LRRK2 rs11564258 single nucleotide polymorphisms with type and extent of gastrointestinal mycobiome in ulcerative colitis: a case-control study. *Gut Pathog.* 2021 Dec 1;13(1).
166. Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2017 Sep 7;23(33):6016–29.
167. Liu Z, Lee J, Krummey S, Lu W, Cai H, Lenardo MJ. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat Immunol.* 2011 Nov;12(11):1063–70.
168. Yang E, Shen J. The roles and functions of Paneth cells in Crohn’s disease: A critical review. *Cell Prolif.* 2021 Jan 1;54(1).
169. Alegre-Abarrategui J, Ansorge O, Esiri M, Wade-Martins R. LRRK2 is a component of granular alpha-synuclein pathology in the brainstem of Parkinson’s disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008 Jun;34(3):272–83.
170. Sharma S, Bandopadhyay R, Lashley T, Renton AEM, Kingsbury AE, Kumaran R, et al. LRRK2 expression in idiopathic and G2019S positive Parkinson’s disease subjects: A morphological and quantitative study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011 Dec;37(7):777–90.
171. Ito G, Iwatsubo T. Re-examination of the dimerization state of leucine-rich repeat kinase 2: Predominance of the monomeric form. *Biochemical Journal.* 2012 Feb 1;441(3):987–94.
172. Corbillé AG, Clairembault T, Coron E, Leclair-Visonneau L, Preterre C, Neunlist M, et al. What a gastrointestinal biopsy can tell us about Parkinson’s disease? *Neurogastroenterol Motil.* 2016 Jul 1;28(7):966–74.
173. Lin CH, Lin HY, Ho EP, Ke YC, Cheng MF, Shiue CY, et al. Mild Chronic Colitis Triggers Parkinsonism in LRRK2 Mutant Mice Through Activating TNF- α Pathway. *Mov Disord.* 2022;37(4).
174. Derkinderen P, de Guilhem de Lataillade A, Neunlist M, Rolli-Derkinderen M. Mild Chronic Colitis Triggers Parkinsonism in LRRK2 Mutant Mice through Activating TNF- α Pathway. *Mov Disord.* 2022 Mar 1;37(3):664–5.
175. Cook DA, Kannarkat GT, Cintron AF, Butkovich LM, Fraser KB, Chang J, et al. LRRK2 levels in immune cells are increased in Parkinson’s disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2017;3(1):1–11.
176. Bliederaeuser C, Zondler L, Grozdanov V, Ruf WP, Brenner D, Melrose HL, et al. LRRK2 contributes to monocyte dysregulation in Parkinson’s disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):123.
177. Fan Y, Howden AJM, Sarhan AR, Lis P, Ito G, Martinez TN, et al. Interrogating Parkinson’s disease LRRK2 kinase pathway activity by assessing Rab10 phosphorylation in human neutrophils. *Biochemical Journal.* 2018;475(1):23–44.
178. Petropoulou-Vathi L, Simitsi A, Valkimadi PE, Kedariti M, Dimitrakopoulos L, Koros C, et al. Distinct profiles of LRRK2 activation and Rab GTPase phosphorylation in clinical samples from different PD cohorts. *NPJ Parkinsons Dis.* 2022 Dec;8(1).
179. Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem.* 2007 Dec 7;282(49):35449–56.

180. Zhao HT, John N, Delic V, Ikeda-Lee K, Kim A, Weihofen A, et al. LRRK2 Antisense Oligonucleotides Ameliorate α -Synuclein Inclusion Formation in a Parkinson's Disease Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Sep 15;8:508–19.
181. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res*. 2013 Jul;62(7):641–51.
182. Yang L, Calingasan NY, Lorenzo BJ, Beal MF. Attenuation of MPTP neurotoxicity by rolipram, a specific inhibitor of phosphodiesterase IV. *Exp Neurol*. 2008 May;211(1):311–4.
183. Zhou Z, Ikegaya Y, Koyama R. The Astrocytic cAMP Pathway in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
184. GRIMM M, PULLMAN W, BENNETT G, SULLIVAN P, PAVLI P, DOE W. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J Gastroenterol Hepatol*. 1995;10(4):387–95.
185. Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica*. 1995;161–75.
186. Christiansen SH, Selige J, Dunkern T, Rassov A, Leist M. Combined anti-inflammatory effects of β 2-adrenergic agonists and PDE4 inhibitors on astrocytes by upregulation of intracellular cAMP. *Neurochem Int*. 2011;59(6):837–46.
187. Prigent A, Chapelet G, De Guilhem de Lataillade A, Oullier T, Durieu E, Bourreille A, et al. Tau accumulates in Crohn's disease gut. *FASEB J*. 2020 Jul 1;34(7):9285–96.
188. Parisiadou L, Yu J, Sgobio C, Xie C, Liu G, Sun L, et al. LRRK2 regulates synaptogenesis and dopamine receptor activation through modulation of PKA activity. *Nat Neurosci*. 2014 Mar;17(3):367–76.
189. Russo I, Di Benedetto G, Kaganovich A, Ding J, Mercatelli D, Morari M, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 controls protein kinase A activation state through phosphodiesterase 4. *J Neuroinflammation*. 2018 Oct 27;15(1).
190. Dugan LL, Kim JS, Zhang Y, Bart RD, Sun Y, Holtzman DM, et al. Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3;274(36):25842–8.
191. Leslie SN, Nairn AC. cAMP regulation of protein phosphatases PP1 and PP2A in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019 Jan 1;1866(1):64–73.
192. Li X, Wang QJ, Pan N, Lee S, Zhao Y, Chait BT, et al. Phosphorylation-dependent 14-3-3 binding to LRRK2 is impaired by common mutations of familial parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(3).

Articles en collaboration

RESEARCH ARTICLE

Tau accumulates in Crohn's disease gut

Alice Prigent¹ | Guillaume Chapelet^{1,2} | Adrien De Guilhem de Lataillade^{1,3} |
Thibault Oullier¹ | Emilie Durieu¹ | Arnaud Bourreille¹ | Emilie Duchalais¹ |
Kévin Hardonnière⁴ | Michel Neunlist¹ | Wendy Noble⁵ | Saadia Kerdine-Römer⁴ |
Pascal Derkinderen^{1,3} | Malvyne Rolli-Derkinderen¹

¹Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Université de Nantes, Nantes, France

²Clinical Gerontology Department, CHU Nantes, Nantes, France

³Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

⁴Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

⁵Department of Basic and Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, King's College London, London, UK

Correspondence

Pascal Derkinderen, Inserm U1235 Nantes, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Université de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France.

Email: pascal.derkinderen@chu-nantes.fr; derkinderenp@yahoo.fr

Funding information

centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens (CECAP); Parkinsonien de Vendée (FFGP)

Abstract

A sizeable body of evidence has recently emerged to suggest that gastrointestinal (GI) inflammation might be involved in the development of Parkinson's disease (PD). There is now strong epidemiological and genetical evidence linking PD to inflammatory bowel diseases and we recently demonstrated that the neuronal protein alpha-synuclein, which is critically involved in PD pathophysiology, is upregulated in inflamed segments of Crohn's colon. The microtubule associated protein tau is another neuronal protein critically involved in neurodegenerative disorders but, in contrast to alpha-synuclein, no data are available about its expression and phosphorylation patterns in inflammatory bowel diseases. Here, we examined the expression levels of tau isoforms, their phosphorylation profile and truncation in colon biopsy specimens from 16 Crohn's disease (CD) and 6 ulcerative colitis (UC) patients and compared them to samples from 16 controls. Additional experiments were performed in full thickness segments of colon of five CD and five control subjects, in primary cultures of rat enteric neurons and in nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) knockout mice. Our results show the upregulation of two main human tau isoforms in the enteric nervous system (ENS) in CD but not in UC. This upregulation was not transcriptionally regulated but instead likely resulted from a decrease in protein clearance via an Nrf2 pathway. Our findings, which provide the first detailed characterization of tau in CD, suggest that the key proteins involved in neurodegenerative disorders such as alpha-synuclein and tau, might also play a role in CD.

KEYWORDS

alpha-synuclein, Crohn's disease, enteric nervous system, Nrf2, Tau

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; CD, Crohn's disease; EGTA, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; ENS, enteric nervous system; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GI, gastrointestinal; MAPT, microtubule-associated protein tau; NDP52, nuclear dot protein 52 kDa; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PD, Parkinson's disease; PSP, progressive supranuclear palsy; RPS6, ribosomal protein S6; SDS, sodium dodecyl sulfate; SNCA, synuclein alpha; TBS, tris-buffered saline; UC, ulcerative colitis.

Alice Prigent, Guillaume Chapelet, and Adrien De Guilhem de Lataillade contributed equally to this work.

Pascal Derkinderen and Malvyne Rolli-Derkinderen Co-senior authorship.

Enteric synucleinopathy: from trendy concept to real entity.

Adrien de Guilhem de Lataillade^{1,2}, Thibaud Lebouvier³, Wendy Noble⁴, Laurène Leclair-Visonneau¹, Pascal Derkinderen^{1,2}

¹ *Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France*

² *CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, F-44093, France*

³ *Univ. Lille, Inserm URM_S1172, CHU Lille, DistAlz, Licend, F-59000 Lille, France*

⁴ *King's College London, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, Department of Basic and Clinical Neuroscience, Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, 5 Cutcombe Road, Camberwell, London. SE5 9RX, UK*

Corresponding author:

Pascal Derkinderen · Inserm U1235 Nantes · 1 rue Gaston Veil · 44035 Nantes · France · Tel: +33(0)240165202 · Fax: +33(0)240165203
pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Submitted: 29 July 2020

Accepted: 23 August 2020

Copyedited by: Aivi T. Nguyen

Published: 28 August 2020

Abstract

An accumulating body of literature has emerged in the past 25 years to show that Parkinson's disease (PD) is not only a disorder of the brain but also of the gastrointestinal tract and more generally of the gut-brain axis. Gastrointestinal symptoms occur in almost every PD patient at some point and in nearly every case examined pathologically autopsy studies find alpha-synuclein deposits, the pathological hallmarks of PD, in the enteric nervous system. This concept of 'enteric synucleinopathy' led to the hypothesis that the enteric nervous system might play a pivotal role in the initiation and spreading of PD. Although this hypothesis opens up interesting perspectives on the pathogenesis of neurodegenerative disorders, some important questions are still pending. The present opinion paper describes and compares the physiological and pathophysiological properties of alpha-synuclein in the brain and the enteric nervous system. We conclude that the existing data supports the existence of pathological alpha-synuclein species in the gut in PD. We also discuss if gut-brain interactions are important in other neurodegenerative disorders.

Keywords: Synucleinopathies, Tauopathies, Enteric nervous system, Aggregates, Alpha-synuclein, Parkinson's disease

Abbreviations

AD - Alzheimer's disease, **ENS** - enteric nervous system, **GI** - Gastrointestinal, **LB** - Lewy bodies, **LN** - Lewy neurites, **PD** - Parkinson's disease, **PMCA** - protein misfolding cyclic amplification, **PSP** - progressive supranuclear palsy

The enteric nervous system (ENS) is an intricate neural network embedded within the gastrointestinal (GI) tract and distributed from the lower oesophagus to the rectum. Compared to other components of the peripheral nervous system, the ENS shows some unique features that closely resemble the CNS and therefore it is sometimes referred to

Comparison of commercially available antibodies for the detection of phosphorylated alpha-synuclein in primary culture of ENS

Simon Lassoze^{1 2}, Adrien de Guilhem de Lataillade^{1 2}, Thibault Oullier¹, Michel Neunlist¹, Laurene Leclair-Visonneau^{1 2}, Pascal Derkinderen^{1 2}, Sébastien Paillusson¹

Affiliations + expand

PMID: 35279896 DOI: 10.1111/nmo.14354

Abstract

Background: It is now well established that phosphorylated alpha-synuclein histopathology, the pathologic hallmark of Parkinson's disease (PD) is not limited to the brain but also extends to the enteric nervous system (ENS). This observation led to the hypothesis that the ENS could play a pivotal role in the development of PD. Research on the enteric synucleinopathy has, however, been hampered by difficulties in detecting phosphorylated alpha-synuclein in the ENS by Western blotting, even when the transferred membrane is fixed with an optimized protocol. This suggests that the available antibodies used in previous studies lacked of sensitivity for the detection of phosphorylated alpha-synuclein at Ser129 in enteric neurons. Here, we evaluated three recent commercially available phospho-alpha-synuclein antibodies and compared them to two antibodies used in previous research.

Methods: The specificity and sensitivity of the 5 antibodies were evaluated by Western blot performed with recombinant alpha-synuclein and with protein lysates from rat primary cultures of ENS. In primary culture of ENS, additional experiments were performed with the most specific antibody in order to modulate alpha-synuclein phosphorylation and to validate its utilization in immunofluorescence experiments.

Results: The rabbit monoclonal antibody D1R1R uniquely and robustly detected endogenous phosphorylated alpha-synuclein at Ser129 in rat primary culture of ENS without any non-specific bands, allowing for a reliable analysis of phosphorylated alpha-synuclein regulation by pharmacologic means.

Conclusions and inferences: Using D1R1R antibody together with the optimized protocol for membrane fixation may help deciphering the signaling pathways involved in enteric alpha-synuclein post-translational regulation in PD.

Keywords: Parkinson's disease; Western blot; alpha-synuclein; enteric neuron; phosphorylation.

Titre : LRRK2 entérique : un lien entre maladie de Parkinson et maladie de Crohn ?

Mots clés : LRRK2, Maladie de Parkinson, Maladie de Crohn, Système nerveux entérique

Résumé : LRRK2 est un gène impliqué dans la maladie de Parkinson (MP) ainsi que dans la maladie de Crohn (MC). Bien qu'a priori sans rapport, ces deux pathologies partagent en fait une part de phénotype commun au niveau digestif, marqué notamment par une inflammation et un métabolisme altéré de l' α -synucléine. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que Lrrk2 entérique pourrait être un maillon moléculaire commun aux mécanismes pathologiques des MC et MP. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris d'étudier Lrrk2 dans des biopsies coliques de patients atteints des MC ou MP, ainsi que de sujets témoins. Nous avons montré que Lrrk2 était exprimée dans le SNE (ganglions myentériques et sous-muqueux), aussi bien par les neurones que par les cellules gliales entériques (CGE). Nous avons observé une augmentation de l'expression de Lrrk2 entérique dans la muqueuse/sous-muqueuse de la MC qui contraste avec la baisse d'expression et d'activité kinase de Lrrk2 dans la MP. Pour préciser l'implication du système nerveux entérique (SNE) dans ces résultats, nous avons quantifié l'expression de Lrrk2 dans les ganglions du SNE. Aucune différence n'a été observée entre des patients parkinsoniens et des sujets témoins. Nous avons également mis en lumière un mécanisme de régulation transcriptionnelle de LRRK2 par la voie AMPc dans les CGE. Au total, nos données humaines originales, générées à la fois en conditions physiologique et pathologique, nous permettent de proposer des hypothèses sur les rôles distincts que pourrait tenir Lrrk2 entérique dans les MP et MC.

Title : Enteric LRRK2 : a link between Parkinson's disease and Crohn's disease ?

Keywords : LRRK2, Parkinson's disease, Crohn's disease, Enteric nervous system

Abstract : Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is genetically associated with both Parkinson's disease (PD) and Crohn's disease (CD). Besides the genetics aspects, these two seemingly unrelated disorders also share common features such as gastrointestinal (GI) inflammation, epidemiological links and impaired α -synuclein metabolism. These observations suggest that Lrrk2 may sit at the crossroads between PD, CD and GI inflammation. The aim of the current research was therefore to study the expression levels and kinase activity of Lrrk2 in the GI tract in both pathological and physiological conditions. We first showed that the two main ganglia of the enteric nervous system (ENS), namely the myenteric and submucosal ganglia expressed Lrrk2, both in enteric neurons and glial cells. We further showed that Lrrk2 expression levels were increased in colonic biopsies from CD patients, sharply contrasting with the decrease in Lrrk2 levels and kinase activity observed in PD samples. In order to get a more precise view on the involvement of the ENS, we quantified Lrrk2 expression levels in ENS ganglia, but didn't find any difference between PD patients and non-neurodegenerative controls. In addition, we also showed that Lrrk2 expression was tightly regulated by the cAMP pathway in enteric glial cells. Taken as a whole, our data provide new insights into the possible role of Lrrk2 in the GI tract in both physiological and pathological conditions.