



HAL
open science

Mécanismes moléculaires et de signalisation induits par le stress oxydatif dans des modèles *in vivo* de la maladie de Parkinson chez la drosophile : intoxication au paraquat et expression de l' α -synucléine

Marlène Cassar

► **To cite this version:**

Marlène Cassar. Mécanismes moléculaires et de signalisation induits par le stress oxydatif dans des modèles *in vivo* de la maladie de Parkinson chez la drosophile : intoxication au paraquat et expression de l' α -synucléine. Neurosciences. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66556 . tel-00827809

HAL Id: tel-00827809

<https://theses.hal.science/tel-00827809>

Submitted on 29 May 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Neurobiologie
(ED3C)

Présentée par

Marlène Cassar

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Mécanismes moléculaires et de signalisation induits par le stress oxydatif dans des modèles *in vivo* de la maladie de Parkinson chez la drosophile : intoxication au paraquat et expression de l' α -synucléine.

soutenue le 13 Novembre 2012

devant le jury composé de :

M. Jean-René Martin Rapporteur

M. Bertrand Mollereau Rapporteur

M. Jean Antoine Girault Examineur

M. Alain Prochiantz Examineur

M. Thomas Riemensperger Examineur

M. Serge Birman Directeur de thèse

Mécanismes moléculaires et de signalisation induits par le stress oxydatif dans des modèles in vivo de la maladie de Parkinson chez la drosophile : l'intoxication au paraquat et l'expression de l'alpha-synucléine

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par la perte progressive des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire, une structure sous-corticale des ganglions de la base. Si la majorité des cas sont sporadiques, l'exposition à des facteurs environnementaux (composés organochlorés, pesticides) ou des mutations associées à une quinzaine de gènes (dardarine, α -synucléine,...) sont connues pour être à l'origine de formes de cette maladie. L' α -synucléine est également le composant majoritaire des corps de Lewy, inclusions cytoplasmiques présentes dans les neurones DA des patients. Pendant mon doctorat, je me suis attachée à comprendre les mécanismes de neurotoxicité induits par le paraquat (PQ), un générateur de stress oxydatif impliqué dans la MP. Ces recherches ont mis en évidence une implication de la signalisation DA dans la toxicité du PQ dans le système nerveux central par l'activation aberrante d'un récepteur DA de type D1, impliqué dans la mémoire chez la drosophile. L'inactivation de ce récepteur dans les neurones glutamatergiques protège significativement les drosophiles contre les effets délétères du PQ. Je me suis également intéressée aux mécanismes de neurotoxicité de l' α -synucléine chez la drosophile et son rapport avec le stress oxydatif. Cette étude m'a mené au développement d'une technique de mise en culture du système nerveux central entier de drosophile permettant l'étude des effets progressifs de l' α -synucléine sur la dynamique vésiculaire dans les axones DA par des expériences de FRAP. Ces travaux contribuent à mieux comprendre les rapports entre dopamine et stress oxydatif dans la pathogenèse de la MP.

Mots clés : Maladie de Parkinson ; stress oxydatif ; Drosophila ; Système nerveux central ; paraquat ; alpha-synucléine.

Molecular and signaling mechanisms induced by oxidative stress in a Drosophila in vivo model of Parkinson's disease: paraquat intoxication and alpha-synuclein expression.

Parkinson's disease (PD) is well characterized as a neurodegenerative disease with progressive loss of dopaminergic neurons (DAn) from substantia nigra, a subcortical structure of the basal ganglia. Most of time, PD is sporadic but it is known that exposure to environmental toxins like pesticides or mutations of genes like α -synuclein can cause PD. α -synuclein is the main component of Lewy's bodies, which are cytoplasmic inclusions present in DAn in PD. During my Ph.D., I focused first on the study of paraquat (PQ) neurotoxicity, a strong oxidative stress generator involved in PD. Our results show that PQ toxicity can be triggered by dopamine signaling through a D1-like dopamine receptor known mainly for its involvement in memory processes in Drosophila. Inactivation of this receptor in glutamatergic neurons was found to be protective against PQ toxicity in Drosophila. Later, I focused on the study of α -synuclein neurotoxicity and its relationship with oxidative stress. This led to the development of a whole Drosophila central nervous system explants culture technique that allowed study of α -synuclein effects on vesicular dynamic along the axons of DAn through FRAP experiments. This study led to a better understanding of the relationships between DA and oxidative stress in the PD's pathogenesis.

Key words : Parkinson's disease ; oxidative stress ; Drosophila ; central nervous system ; paraquat ; alpha-synuclein.

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire de Neurobiologie UMR-CNRS 7637

ESPCI Paris-Tech, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris CEDEX 5

Table des matières

Table des matières	2
Table des figures et tableaux	6
Table des abréviations	8
INTRODUCTION :	12
Partie I : Le stress oxydatif	13
1 Stress oxydatif	13
1.1 Généralités	13
1.2 Mode d'action	14
2 Cibles cellulaires du stress oxydant	15
2.1 Les mitochondries :	15
2.2 Le réticulum endoplasmique et le rôle du calcium :	19
3 Mécanisme cellulaire de réponse	22
3.1 Les antioxydants et protéines de détoxification	23
3.2 Les superoxydes dismutases (SODs) :	23
3.3 NADPH oxydases :	24
4 Les mécanismes de mort cellulaire	24
4.1 La mort programmée : l'apoptose	24
4.1.1 Description de la voie extrinsèque	25
4.1.2 Description de la voie intrinsèque	26
4.2 La mort non-programmée : la nécrose	28
4.3 L'autophagie :	28
5 Agents oxydants : paraquat et roténone	29
5.1 Le paraquat	29
5.1.1 Généralités	29
5.1.2 Mode d'action	30
5.1.3 La réaction de Fenton :	32
5.2 La roténone	32
Partie II : Stress oxydant et maladie de Parkinson	34
1 Présentation de la maladie	34
2 Les différentes causes de la maladie :	35
2.1 Facteurs génétiques	36
2.1.1 PARK1/4 : SNCA	38
2.1.2 PARK2 : parkin :	40
2.1.3 PARK6 : Pink1 :	42
2.1.4 PARK7 : DJ-1	42
2.1.5 PARK8 : LRRK2:	43
2.1.6 PARK9 : ATP13A2	43
2.1.7 Glucocerebrosidase :	44
2.2 Facteurs environnementaux	44
2.2.1 MPTP :	44
2.2.2 Roténone :	45
2.2.3 Paraquat :	46

3	Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondrial dans la MP :	46
4	Les traitements :	48
4.1	Traitements de type médicament :	48
4.2	Traitements chirurgicaux :	49
4.3	Autres types de traitements :	50
Partie III : La drosophile comme modèle d'étude du système nerveux et de ses maladies		51
1	Le système nerveux central de la drosophile	51
1.1	Le cerveau et ses composants	52
1.2	Le ganglion suboesophagien	53
1.3	La corde ventrale	53
1.4	Les différents types de cellules nerveuses chez la drosophile	54
1.4.1	Les neurones :	55
1.4.2	Les cellules gliales :	56
2	La dopamine	57
2.1	Rôles de la dopamine chez la drosophile	59
2.2	Le système dopaminergique chez la drosophile	60
2.3	Les récepteurs dopaminergiques chez la drosophile	61
3	Le glutamate	64
3.1	Rôles du glutamate chez la Drosophile	64
3.2	Les neurones glutamatergiques chez la Drosophile :	66
3.2.1	Les interneurones	66
3.2.2	Les motoneurones	67
4	Modélisation des maladies neurodégénératives :	67
4.1	Maladies par expansion de polyglutamine et maladie d'Alzheimer	69
4.1.1	Les maladies par expansion de polyglutamines (polyQ)	69
4.1.2	La maladie d'Alzheimer	70
4.2	Maladie de Parkinson	74
OBJECTIFS DE LA THESE		80
MATERIELS ET METHODES :		82
1	Les drosophiles	82
2	Tests de survie	83
3	Quantification de l'ingestion	85
4	Culture des systèmes nerveux adultes ex vivo	87
5	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)	89
6	Imagerie Calcique	90
RESULTATS :		92
Partie I : Travaux sur le modèle paraquat		93
Chapitre 1: Altérations de la machinerie des microARNs chez les drosophiles intoxiquées au paraquat		93
Chapitre 2 : Modulation de la neurotoxicité du paraquat par un récepteur dopaminergique chez la drosophile		103
Partie II : Travaux sur le modèle α-synucléine		139
Chapitre 1 : Neurotoxicité différentielle des formes sauvage et mutée de l' α -synucléine humaine exprimées dans les neurones de la drosophile		139

Chapitre 2 : Une seule voie dopaminergique est à la base des défauts moteurs dans un modèle de la maladie de Parkinson chez la drosophile	166
Chapitre 3 : Etude des mécanismes des neurodégénérescences sur des cultures d'explants de systèmes nerveux centraux entiers de drosophile	185
Discussion.....	214
1 Le paraquat dans l'étude de la MP.....	214
1.1 Les miARNs : une cause ou une conséquence de la MP ?	215
1.2 Une forte implication de la signalisation dopaminergique dans la pathologie.....	216
2 L' α-synucléine dans l'étude de la MP.....	218
2.1 Une forte toxicité de l'a-synucléine A30P pour les neurones dopaminergiques de la drosophile	218
3 Avancées technologiques	221
REFERENCES :	223
ANNEXE	261

Table des figures et tableaux

FIGURE 1 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE MONTRANT LA STRUCTURE DES MITOCHONDRIES.	16
FIGURE 2: SCHEMA DESCRIPTIF DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE (CRM).	17
FIGURE 3 : SCHEMA DESCRIPTIF DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE.	18
FIGURE 4: SCHEMA REPRESENTATIF DE LA LIBERATION DES NEUROTRANSMETTEURS DANS LE CAS D'UNE SYNAPSE CHIMIQUE.	20
FIGURE 5 : SCHEMA DE DECLENCHEMENT DE L'APOPTOSE CHEZ LA DROSOPHILE ET CHEZ LES MAMMIFERES.	27
FIGURE 6 : STRUCTURE CHIMIQUE DU PARAQUAT	29
FIGURE 7 : SCHEMA REPRESENTATIF DU MODE D'ACTION DU PARAQUAT.....	31
FIGURE 8 : FORMULE DE LA REACTION DE FENTON.....	32
FIGURE 9 : FORMULE CHIMIQUE DE LA ROTENONE.	33
FIGURE 10 : SCHEMA MONTRANT LES CONSEQUENCES DE LA DEGENERESCENCE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES SUR LES CONNEXIONS AU SEIN DU STRIATUM (D'APRES DINIS-OLIVEIRA ET AL., 2006).....	35
TABLEAU 1: TABLEAU RECAPILATIF DES 18 GENES IMPLIQUES DANS LA MP.	37
FIGURE 11 : REPRESENTATION DE L'a-SYN MONTRANT LES DIFFERENTS DOMAINES DE LA PROTEINE ET LOCALISANT LES MUTATIONS PONCTUELLES CONNUES DE LA MP.....	39
FIGURE 12 : SCHEMA REPRESENTATIF DE L'AGGREGATION DES FILAMENTS DE L'A-SYN (D'APRES CORTI, LESAGE ET BRICE, 2011).	39
FIGURE 13 : REPRESENTATION DE LA FORMULE DU MPTP.....	44
FIGURE 14 : STIMULATION A HAUTE FREQUENCE : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EMPLACEMENT DES ELECTRODES DANS LE CERVEAU ET DU BOITIER DE STIMULATION.....	49
FIGURE 14 : REPRESENTATION DU SNC DE LA DROSOPHILE.....	51
FIGURE 15 : REPRESENTATION EN 3D DES PRINCIPALES STRUCTURES DU CERVEAU ADULTE DE DROSOPHILE.....	52
FIGURE 16 : ORGANISATION DU SNC CHEZ L'ADULTE.....	54
FIGURE 17 : COMPARTIMENTATION DES NEURONES ET DES CELLULES GLIALES DANS LE SNC DE LA DROSOPHILE (HARTENSTEIN 2011).	55
FIGURE 18 : POLARITE DES NEURONES DE DROSOPHILE (ROLLS, 2011) (D'APRES STONE ET AL. 2010).....	56
FIGURE 19 : FORMULE CHIMIQUE DE LA DOPAMINE.	57
FIGURE 20 : SCHEMA DES DIFFERENTS GROUPES (CLUSTERS) DE NEURONES DOPAMINERGIQUES CHEZ LA DROSOPHILE ADULTE (MONASTIRIOTI, 1999).	58
FIGURE 21 : VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA DOPAMINE CHEZ LA DROSOPHILE.	60
FIGURE 22 : RCPGs ET VOIES ASSOCIEES (BLENAU & BAUMANN, 2001).	62
FIGURE 23 : ACTIVATION DE DAMB DANS LES OVOCYTES DE XENOPE PAR DIFFERENTS NEUROTRANSMETTEURS.	63
FIGURE 24 : REPRESENTATION DE LA FORMULE DU GLUTAMATE.....	64
FIGURE 25 : LA SYNAPSE TRIPARTITE.....	65
FIGURE 26 : SCHEMA REPRESENTATIF DES MOTONEURONES CHEZ LA DROSOPHILE ADULTE (BEAK AND MANN, 2009).....	67
FIGURE 27 : LE SYSTEME UAS-GAL4 CHEZ LA DROSOPHILE. (MUQIT ET FEANY, 2002)	69

FIGURE 28 : LA SUPREXPRESSION DE PAR-1 AUGMENTE LA TOXICITE DE TAU ENVERS LES PHOTORECEPTEURS CHEZ LA DROSOPHILE.....	74
FIGURE 29 : PERTE DU MARQUAGE DE LA TYROSINE HYDROXYLASE DANS DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE DROSOPHILE APRES SUREXPRESSION DE L'α-SYN.....	75
FIGURE 30 : PERTE DE LOCOMOTION CHEZ LES MOUCHES EXPRIMANT DIFFERENTES FORMES DE L'α-SYN DE FAÇON PAN-NEURONALE.	76
FIGURE 31 : LE PARAQUAT INDUIT UNE DEGENERESCENCE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES CHEZ LA DROSOPHILE.	79
FIGURE 32 : FORMULE ET SPECTRE D'ABSORBANCE DE LA SULFORHODAMINE B.....	85
FIGURE 33 : VISUALISATION DE L'INGESTION DE NOURRITURE PAR LE COLORANT ALIMENTAIRE. 86	
FIGURE 34 : TYPE DE RESULTAT OBTENU (RIEMENSBERGER ET AL., 2011).	87
FIGURE 35 : SYSTEME DE MISE EN CULTURE.....	88
FIGURE 36 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE FRAP APPLIQUE A UNE SYNAPSE.	90
FIGURE 37 : ORGANISATION ET FONCTIONNEMENT DE LA SONDE GCAMP3.	91

Table des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AIF : apoptosis inducing factor

α -syn : α -synucléine

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

Apaf1 : Apoptotic protease activating factor 1

Aph-1 : anterior pharynx-defective 1

APP : Amyloid precursor protein

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1

ATF6 : Activating transcription factor 6

ATP : adénosine tri-phosphate

BiP : Binding immunoglobulin protein

CEBP : cAMP-response element-binding protein

CFP : Cyan fluorescent protein

CHOP/GADD153 :

CRM : chaîne respiratoire mitochondriale

CV : corde ventrale

DA : dopamine

DAMB : dopamine receptor in mushroom bodies

DAP : death-associated protein

Dcp-1 : Death caspase-1

DD2R : dopamine 2-like receptor

dDA1/Dumb : dopamine D1-like receptor

DISC : Death-inducible signalling complex

DopEcR : Dopamine/Ecdysteroid receptor
DRP-1 : DAP kinase death associated protein
EndoG : Endonucléase G
ERO : espèce réactive de l'oxygène
FRAP : fluorescence recovery after photobleaching
FRET : fluorescence energy transfert
GAAD : GrA-activated DNase
GABA : γ -Aminobutyric acid
GBA : glucocerebrosidase
GFP : green fluorescent protein
Glu : glutamate
GrA : Granzine A
DriCE : capase-3
GSO : ganglion suboesophagien
IAP : inhibiteurs de l'apoptose
IN : interneurone
IRE1 : inositol requiring protein-1
JNK : c-Jun N-terminal kinases
L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LRRK2 : leucine rich repeat kinase 2
MA : maladie d'Alzheimer
MARK : MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1
MH : maladie de Huntington
miARN : microARN
MP : maladie de Parkinson
MPP+ : 1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAC : non-Abéta component
NAD+ : Nicotinamide adenine dinucleotide

NADH : NAD⁺ réduit

NADP⁺ : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH : NADP⁺ réduit

NFT : neurofibrillary tangles

PAM : neurones photocérébraux antérieurs dorsomédians

PAR-1 : protease-activated receptor-1

PBS : phosphate buffer saline

PDF : pigment dispersing factor

Pen-2 : presenilin enhancer 2

PERK : protéine kinase RNA-like ER kinase

Pink1 : PTEN induced putative kinase 1

PKA : protéine kinase A

polyQ : polyglutamine

PPL2 : neurones photocérébraux postérieurs latéraux

PPM : neurones postérieurs dorsomédians

PQ : paraquat

PSA : puromycin-sensitive aminopeptidase

PSD-95 : postsynaptic density protein 95

RE : réticulum endoplasmique

RISC : RNA-inducing silencing complex

ROI : region of interest

SCA : ataxies spinocérébelleuses

SHF : stimulation électrique à haute fréquence

SNARE : SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

SNpc : substantia nigra pars compacta

SOD : superoxyde dismutase

TH : tyrosine hydroxylase

UAS : Upstream Activation Sequence

UBQLN1 : Ubiquilin-1

UPR : Unfolded protein response

XBP1 : X-box binding protein 1

YFP : yellow fluorescent protein

INTRODUCTION :

Partie I : Le stress oxydatif

1 Stress oxydatif

1.1 Généralités

Le stress oxydatif est une conséquence parfois néfaste mais naturelle de l'absorption d'oxygène lors de la respiration. Le processus respiratoire aérobie est apparu après la photosynthèse et a été conservé car il présente un véritable avantage sur le plan énergétique. En effet, ce processus permet de produire 18 fois plus d'énergie par glucose consommé que la voie de la glycolyse, favorisant le développement d'organismes plus complexes et plus gros (A.-F. Miller 2012). L'oxygène est source de radicaux libres appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO), on estime à 2% la quantité d'oxygène absorbée par les cellules produisant ce stress (Boveris et al. 1971; Calabrese et al. 2007). En effet, les radicaux libres sont responsables de nombreux dégâts dans les organites intracellulaires, particulièrement dans les mitochondries. Ils peuvent également toucher les protéines créant des défauts de repliement. Les radicaux libres sont également responsables de nombreux dommages au niveau des acides nucléiques, autant pour l'ARN que l'ADN génomique (Bohr 2002). Cependant, les ERO ont également un rôle vital dans la cellule car ils interviennent dans de nombreuses voies métaboliques avec le calcium et les réseaux de protéines de phosphorylation (Kobayashi et al. 2007; Ogasawara et al. 2008; Mittler et al. 2011).

Les ERO sont des formes réduites de l'oxygène de l'atmosphère. Elles résultent de l'excitation de O_2 , permettant la formation d'un oxygène célibataire. Cet O_2 peut recevoir 1, 2 ou 3 électrons ce qui permet de former respectivement le radical superoxyde (O_2^-), hydrogène peroxide (H_2O_2) et l'hydroxyl radical (HO^\cdot) (Mittler 2002).

Il existe plusieurs sources potentielles de ERO dans les cellules. La NADPH oxidase, une enzyme membranaire, est un générateur majeur de ERO. C'est une enzyme faisant partie d'une vaste famille de 7 membres et très conservée. Elle existe aussi bien chez les plantes que chez les mammifères et les autres animaux (Brown and Griending 2009; Aguirre and Lambeth 2010). Ces enzymes permettent la génération régulée de ERO. Les mitochondries sont également une grande source de ERO, notamment au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) qui peuvent participer à la genèse d'ions superoxydes. Il existe également d'autres enzymes comme la xanthine oxidase, enzyme qui permet de former l'acide urique, les cyclooxygénases qui permettent de synthétiser les prostaglandines qui participent à la signalisation paracrine et autocrine, les enzymes de la famille du cytochrome p450 qui catalysent l'oxydation de nombreux substrats comme des médicaments, et la lipoxygénase qui catalyse l'oxydation des acides gras. Toutes ces enzymes produisent du stress de par leurs processus enzymatique (Finkel 2011).

Les ERO participent également au phénomène d'hormèse des mitochondries (ou mitohormesis). La mitohormesis est due à une augmentation des ERO dans les mitochondries qui cause une réponse adaptative permettant l'augmentation de la résistance au stress et une réduction à long terme du stress oxydatif. Cet effet peut être lié à un effet positif de l'exercice physique chez l'homme, ainsi qu'à des restrictions caloriques et en glucose. Des travaux ont montré que l'utilisation des antioxydants dans un contexte positif mène à l'inhibition des ERO et de leur signalisation dans les mitochondries et donc une diminution de la mitohormesis et de ses effets positifs (Ristow and Zarse 2010).

1.2 Mode d'action

Le stress oxydatif est naturellement présent dans l'organisme. En temps normal, le stress oxydatif n'est pas délétère car les cellules ont mis en place des mécanismes dits antioxydants pour se protéger contre l'oxygène.

L'une des sources majeures de stress oxydatif est la mitochondrie. Elle contient en effet de nombreuses molécules, coenzymes et enzymes impliquées dans la formation d'ERO et la réponse au stress oxydatif. De par ses fonctions respiratoires, elle est plus particulièrement vulnérable à toutes sortes de stress (Wallace 2002; L. J. Martin 2012).

D'autres organites cellulaires sont aussi particulièrement vulnérables au stress oxydatif. Le réticulum endoplasmique (RE) en fait partie. Il participe au repliement des protéines mais également au stockage du Ca²⁺ intracellulaire.

2 Cibles cellulaires du stress oxydant

2.1 Les mitochondries :

Ces organites respiratoires sont adaptés pour produire de l'énergie à partir de protons (H⁺), d'oxygène ainsi que de sucres présents dans les cellules. D'origine endosymbiotique, Les mitochondries sont des organites très dynamiques et complètement adaptés à l'environnement de la cellule eucaryote à laquelle elles se sont associées il y a près de 2 milliards d'années. Elles possèdent leur propre ADN mitochondriale (ADNmt) qui permet la production de protéines essentielles composant des complexes respiratoires I, III, IV et V, ainsi que certaines protéines associées et également des ribosomes et certains ARNs de transfert. *A contrario*, on sait que le complexe II est codé dans le noyau de la cellule, ce qui est sans doute lié à la transmission maternelle de la mitochondrie et au rôle crucial du complexe II dans la chaîne de transport des électrons (Craigen William 2012). La mitochondrie se compose d'une matrice, d'un espace intérieur délimité par la membrane interne qui forme des replis caractéristiques (Figure 1) appelés crêtes mitochondriales, d'un espace intermembranaire dans lequel s'accumulent les protons utilisés comme moteur de la phosphorylation oxydative (réaction de la respiration aérobie), et d'une membrane externe qui sépare la mitochondrie du reste de la cellule (Keane et al. 2011).

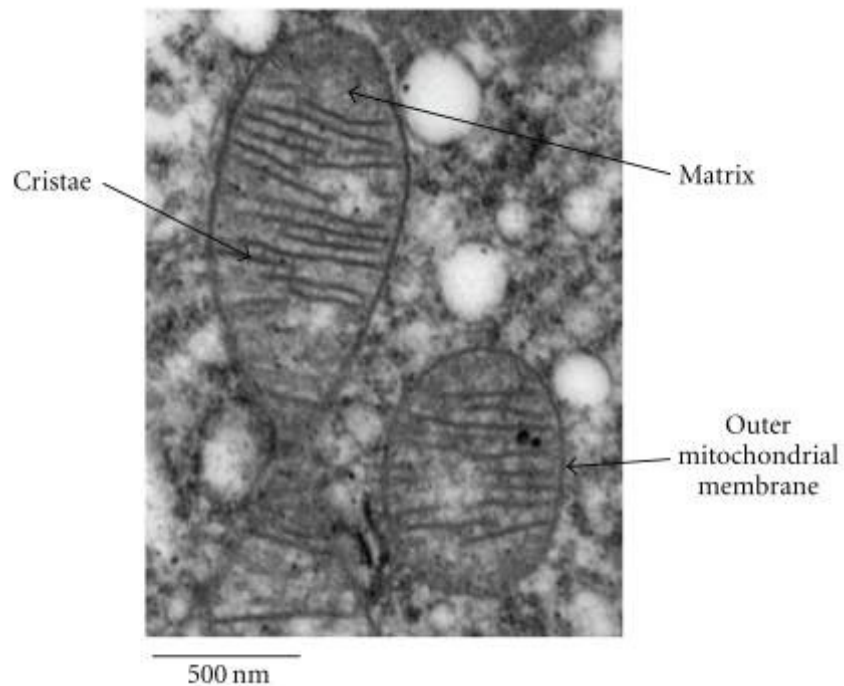


Figure 1 : Microscopie électronique montrant la structure des mitochondries.

On aperçoit les crêtes mitochondriales qui apparaissent comme des traits transversaux à l'intérieur de la matrice (Keane et al. 2011).

La respiration mitochondriale s'effectue grâce à un complexe protéique permettant la production d'adénosine triphosphate (ATP), appelé chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Les protéines qui composent ce complexe se trouvent associées à la membrane interne. La production d'ATP nécessite un gradient de proton. La CRM se compose de 5 unités protéiques : les complexes I, II, III et IV ainsi que l'ATP synthétase (Figure 2).

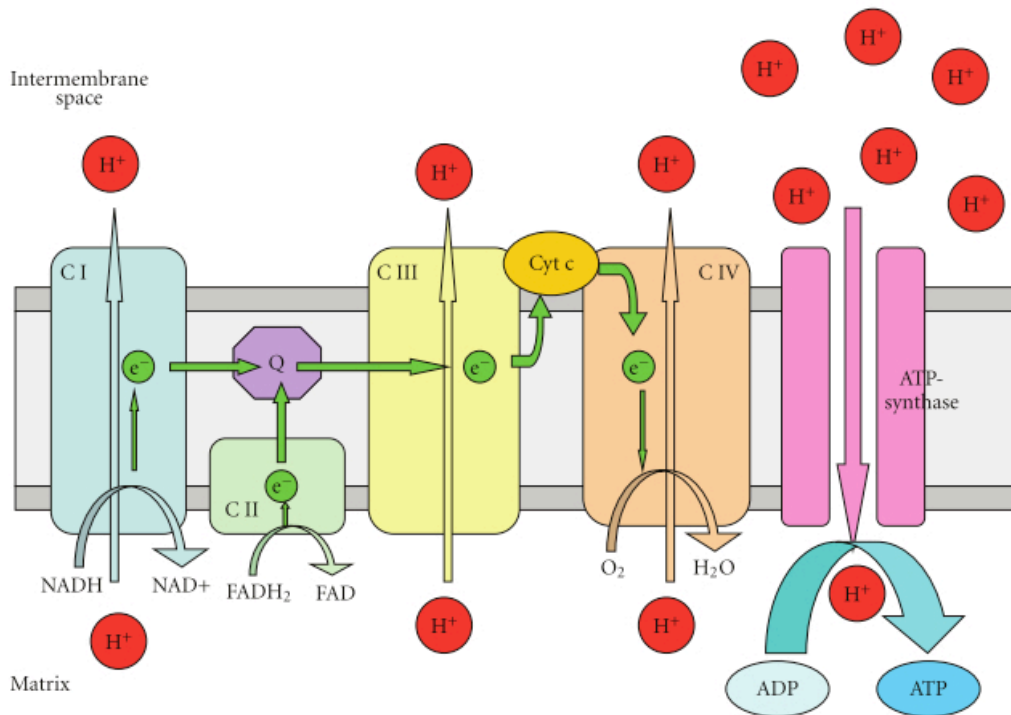


Figure 2: Schéma descriptif de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).

La CRM est composée de 5 complexes, chacun contribuant au transport d'électrons (e^-) qui permet de générer le gradient de protons (H^+) permettant la synthèse de l'ATP par le 5^{ème} complexe. Les complexes I et II (CI et CII) utilisent respectivement le NADH et le FADH2 pour récupérer le nombre d' e^- nécessaire pour générer le premier gradient de H^+ . Ils utilisent tous deux le co-facteur Q pour le transport des e^- vers le complexe III (CIII), ce qui permet un nouveau gradient de H^+ vers l'espace intermembranaire. Le e^- est par l'intermédiaire du cytochrome c (cyt c) transféré jusqu'au complexe IV (CIV) qui transforme l' O_2 en H_2O et forme ainsi le dernier transfert de H^+ . Les H^+ accumulés dans l'espace intermembranaire sont ensuite pris en charge par l'ATP- synthase. Les H^+ utilisent ce pore pour réintégrer la matrice et permettent ainsi la transformation d'ADP en ATP (Keane et al. 2011).

L'ATP est considéré comme le carburant des cellules car il sert de pile de transport de l'énergie dans la cellule. Il intervient également comme précurseur d'un second messager l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). C'est dans la matrice mitochondriale qu'a lieu le cycle de Krebs qui participe également à la respiration par la réduction du nicotinamide

adénine dinucléotide (NAD^+) en NADH à partir de l'oxydation du glucose et autres nutriments. Le NADH contribue directement à la phosphorylation oxydative (figure 3).

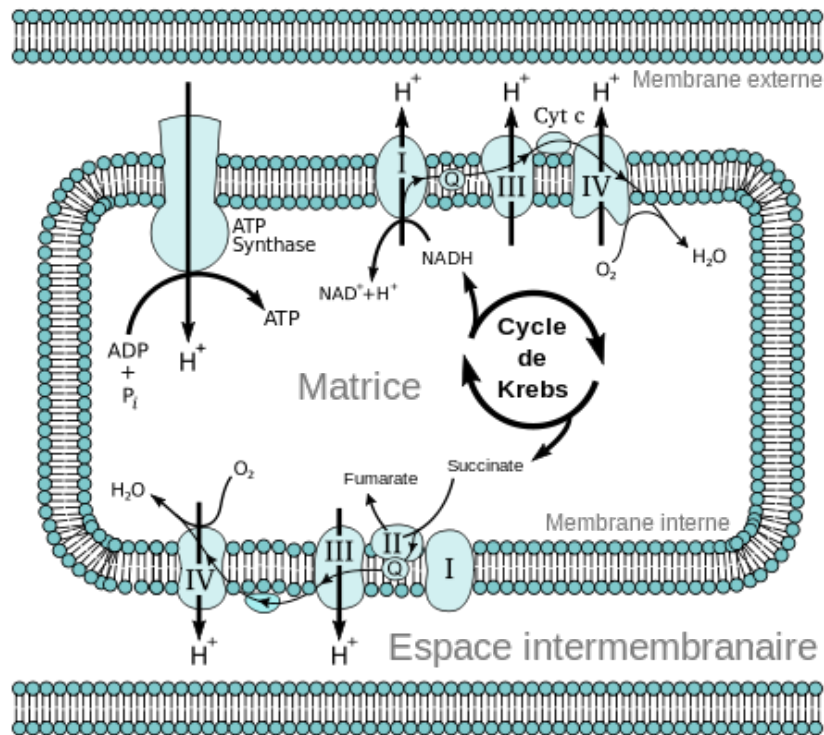


Figure 3 : Schéma descriptif de la phosphorylation oxydative.

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la génération du stress oxydatif. En effet, la CRM est une chaîne à électrons qui permet la génération d'un gradient de proton entre l'espace intermembranaire et la matrice de la mitochondrie. La libération permanente de protons dans l'espace intermembranaire facilite la génération de stress oxydatif. Les principales sources de ERO dans la CRM sont le complexe I et le complexe III. Le complexe I génère des ERO par utilisation d'un fort potentiel de membrane lié à un important gradient de proton. D'une part, il est capable d'effectuer un transport d'électron inverse du coenzyme Q vers le NADH , mais cet effet est thermodynamiquement très peu avantageux et génère des H_2O_2 (Turrens 2003; Hinkle et al. 1967). D'autre part, le complexe I est capable de générer des ERO directement par le NAD^+ , ce qui nécessite également un fort gradient de protons (Starkov

and Fiskum 2003). Le complexe III est également une source importante de ERO de la CRM. Il est capable de générer des ions superoxydes à cause d'une instabilité de la semiquinone au niveau du coenzyme Q (Rich and Bonner 1978). De plus, par l'entraînement de dysfonctionnements de la mitochondrie, les radicaux libres avantagent la production de protons (H^+) et de radicaux libres au détriment de la production d'ATP. Ce défaut en production d'ATP est lié aux mécanismes de détoxification présents dans les mitochondries et qui nécessitent généralement le détournement des fonctions normales de la CRM pour réduire la quantité de ERO. Il devient alors assez compréhensible qu'une perturbation du fonctionnement des mitochondries puisse avoir des répercussions délétères pour la cellule, avec, entre autre, l'induction de la mort cellulaire programmée, où là encore, la mitochondrie détient un rôle prépondérant (Ott et al. 2007).

2.2 Le réticulum endoplasmique et le rôle du calcium :

Le réticulum endoplasmique (RE) participe à la biosynthèse et au repliement des protéines membranaires et sécrétées, et il est également impliqué dans le stockage du calcium intracellulaire. Le RE a donc un rôle très important dans l'homéostasie ainsi que la survie cellulaire, par le contrôle du repliement des protéines, la biosynthèse des lipides, ainsi que le contrôle de l'homéostasie du calcium (Rutkowski and Kaufman 2004).

Les ions calcium (Ca^{2+}) sont impliqués dans de nombreux phénomènes cellulaires. D'une part, ils font partie de nombreuses voies métaboliques centrales et jouent en tant que second messenger un rôle essentiel pour le bon fonctionnement de tous les types de cellules. Les ions Ca^{2+} sont également impliqués dans la libération synaptique des neurotransmetteurs et dans la contraction musculaire. En effet, l'entrée du Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse est nécessaire pour permettre la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Figure 4). Cependant, en plus de toutes ces fonctions physiologiques, il est connu que les ions calciques sont toxiques pour les cellules. En effet, il a été montré dans de nombreux travaux qu'un excès de calcium intracellulaire peut être nocif voir mortel pour les cellules

(Fleckenstein et al. 1974; Leonard and Salpeter 1979; Schanne et al. 1979; Trump and Berezsky 1995; K. Xu, Tavernarakis, and Driscoll 2001) et qu'il peut être à l'origine d'un choc osmotique (Chiong et al. 2010; Gandhi et al. 2011). Il en va de même pour une carence en calcium qui est impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'ostéoporose. La concentration du calcium soluble doit donc être très précisément régulée dans l'ensemble des organes.

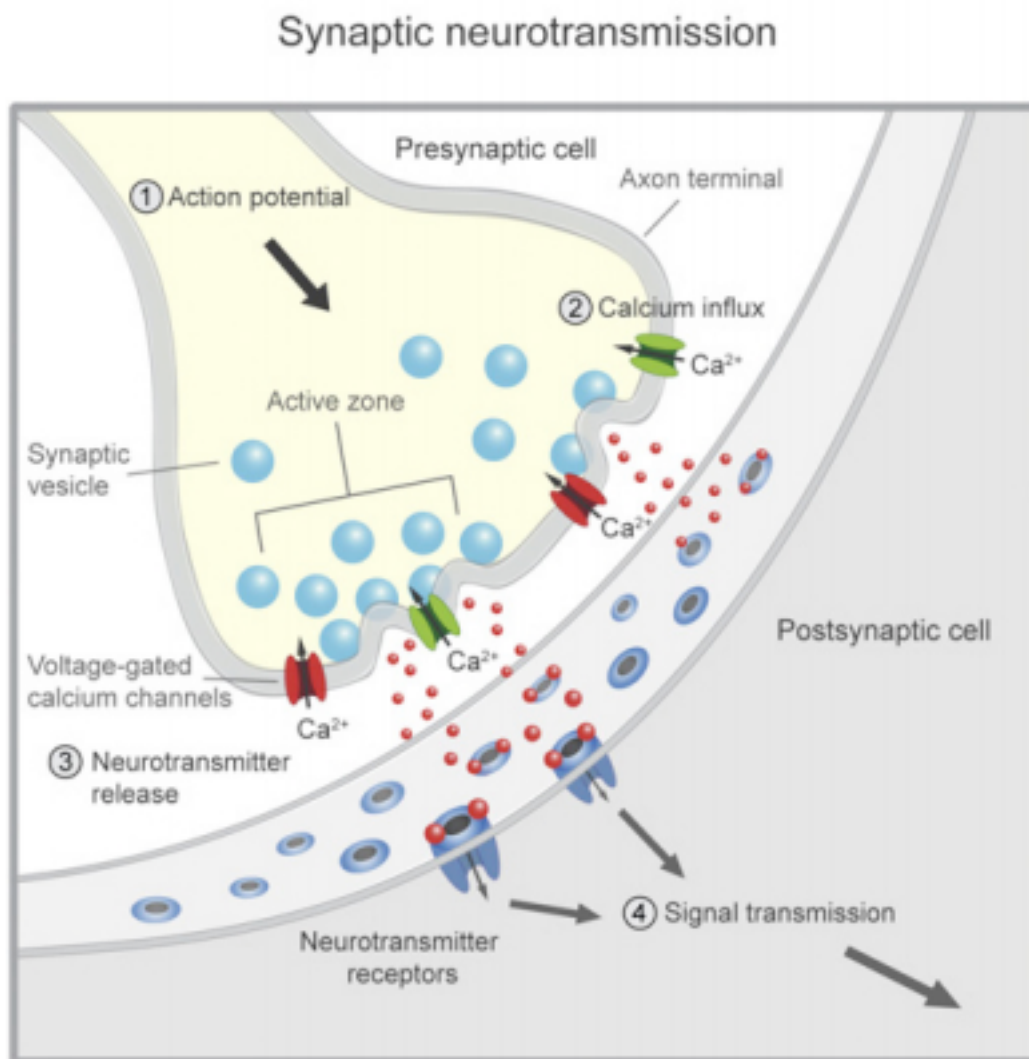


Figure 4: Schéma représentatif de la libération des neurotransmetteurs dans le cas d'une synapse chimique.

Lorsqu'un potentiel d'action (1) arrive au niveau de la synapse, les canaux calciques s'ouvrent sous l'effet de l'augmentation du potentiel de membrane ce qui induit un influx de

calcium dans la zone présynaptique (2) permettant l'ancrage des vésicules remplies de neurotransmetteur au niveau de la membrane plasmique et la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (3). Une fois libérés, les neurotransmetteurs agissent sur leurs récepteurs spécifiques au niveau de la zone post-synaptique pour induire un signal correspondant à leurs caractéristiques (4) (d'après Auer and Ibañez-Tallon, 2010).

Ainsi, le stress du RE peut se caractériser par un dysfonctionnement de ses fonctions du contrôle de l'homéostasie et du bon repliement des protéines. Lors d'une altération de l'homéostasie du RE par accumulation de protéines mal repliées, ou déséquilibre de la balance du calcium ou du potentiel redox, on induit le stress du RE.

Le RE dispose de plusieurs voies de signalisation de réponse au stress que l'on appelle UPR (*Unfolded protein response*). Ces voies permettent de rétablir les fonctions normales du RE par plusieurs effets : une augmentation de la capacité de chargement des protéines par l'expression de protéines chaperonnes et une suractivation des voies de dégradation des protéines mal repliées. En cas de stress trop important, il peut y avoir l'initiation de la mort cellulaire par les protéines des UPR (Tabas and Ron 2011). Ce dernier effet serait responsable de la genèse de nombreuses maladies comme des maladies neurodégénératives (Tabas and Ron 2011; Marciniak and Ron 2006).

Trois voies de l'UPR peuvent être activées en cas de stress du RE. Il s'agit en fait de véritables senseurs du stress du RE. Parmi ces senseurs on trouve : IRE1 (*inositol requiring protein-1*), PERK (*proteine kinase RNA-like ER kinase*) et ATF6 (*activating transcription factor-6*) (Wu and Kaufman 2006).

IRE1 est la plus conservée des voies de l'UPR. En condition dépourvue de stress, il interagit avec BiP (une protéine de liaison à la chaîne lourde de l'immunoglobuline) (Ron and Walter 2007). Lors d'un stress, par exemple une forte accumulation de protéines mal repliées, l'interaction entre les deux protéines est perdue et IRE1 est activée par trans-activation. IRE1 peut également réguler la traduction de XBP1, un facteur de transcription induisant

l'expression de gènes permettant d'augmenter la capacité du RE à replier des protéines ainsi que d'étendre la surface de sa membrane (Glimcher 2010). IRE1 pourrait également être impliquée dans l'induction de l'apoptose par l'activation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) à travers ASK1, une kinase responsable du signal de l'apoptose (Urano et al. 2000).

PERK est une kinase sérine-thréonine assez similaire à IRE1. Présente dans le lumen du RE, elle est activée par trans-activation. Elle permet alors la phosphorylation de eIF2 α , un facteur d'initiation de la traduction, ce qui permet une traduction globale des protéines diminuée, réduisant ainsi le stress du RE lors d'un chargement trop important de protéines (Ron and Walter 2007). L'activation de eIF2 α pourrait aussi avoir un rôle dans l'induction de certaines protéines pro-apoptotiques comme CHOP/GADD153 (*C/EBP α -homologous protein*) (Tabas and Ron 2011).

ATF6 est un facteur de transcription qui migre dans le Golgi en cas de stress du RE et subit un clivage par des protéases. Il devient alors un facteur de transcription, rejoint le noyau et active l'expression des chaperonnes du RE (Rutkowski and Kaufman 2004; Ron and Walter 2007).

3 Mécanisme cellulaire de réponse

Pour contrer les effets délétères du stress oxydatif, les cellules ont mis en place un certain nombre de moyens. En effet, les cellules possèdent des agents antioxydants endogènes, moléculaires ou enzymatiques. Cependant, lorsque le stress est trop important, il peut aboutir à la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie.

3.1 Les antioxydants et protéines de détoxification

Les antioxydants sont des molécules bien connues du grand public. On leur attribue toute sorte d'actions bénéfiques pour l'organisme. Ce sont des molécules qui peuvent être soit naturellement produites par l'organisme, soit encore absorbées par l'alimentation. On sait, par exemple, que la caféine/théine (Viana et al. 2012; K.-H. Chen et al. 2011; Jagdeo and Brody 2011) et de nombreuses autres substances extraites des plantes sont de très bons antioxydants, les exemples les plus connus étant l'acide ascorbique (vitamine C) et la vitamine E. Cependant, les antioxydants seraient à utiliser avec parcimonie car ils pourraient avoir des effets non bénéfiques dans certains cas, en diminuant les effets bénéfiques de l'exercice physique par exemple contre la prévention du stress oxydant (Peternelj and Coombes 2011; Ristow et al. 2009).

3.2 Les superoxydes dismutases (SODs) :

Ces enzymes catalysent la detoxification des ions superoxydes. Ce sont des enzymes qui jouent un rôle fondamental dans le métabolisme des ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Les SODs sont des protéines indispensables dans un environnement aérobie. Il existe 3 grandes familles de SODs, chacune utilisant un cofacteur métallique différent pour effectuer la réaction de catalyse: le nickel (Ni), le cuivre couplé au zinc (Cu/Zn), ou le manganèse ou le fer (Mn ou Fe). Les SODs sont capables de convertir 2 molécules d'anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) accompagné d'une consommation de 2 protons. Chez les eucaryotes, les trois familles de SOD sont présentes mais pour la dernière classe, le Mn est privilégié. Cette prévalence de l'utilisation du Mn au détriment du Fe s'explique par une oxydation de l'atmosphère au cours du temps qui aurait favorisé les tendances naturelles du Fe à s'engager dans une réaction de Fenton. En effet, le Fe aurait alors eut davantage tendance en condition de stress oxydatif à rentrer dans cette réaction avec le superoxyde (A.-F. Miller 2012). De plus, Mn et Fe ont les mêmes caractéristiques chimiques et ont la capacité tous deux de cycliser facilement entre leur état d'oxydation 2^+ et 3^+ . Les SODs n'auraient donc eut aucun inconvénient à préférer le Mn au Fe. Cependant, l'utilisation du Fe

par les SODs est toujours présente chez les bactéries et les chloroplastes, organites présents chez les plantes.

3.3 NADPH oxydases :

Les NADPH oxydases ont pour fonction de générer des EROs qui vont participer à l'induction des gènes de défenses de la cellule, l'activation de facteurs de transcription et la mobilisation du système de transport des ions (Kleniewska et al. 2012). D'abord découvertes dans les cellules phagocytaires sous la forme de plusieurs sous-unités (Rossi and Zatti 1964), il est maintenant connu que les NADPH sont présentes dans toutes les cellules et qu'elles forment une famille de plusieurs protéines. Il existe deux grandes classes de NADPH : les NADPH responsables de la production d'ions superoxydes et les NADPH responsables de la production d' H_2O_2 . Les NADPH sont des protéines membranaires. En effet, deux de ses sous-unités sont responsables de l'ancrage du complexe protéique à la membrane plasmique de la cellule.

4 Les mécanismes de mort cellulaire

Il existe plusieurs types de mort des cellules. Les plus connues sont l'apoptose et la nécrose pour lesquelles on connaît assez bien l'enchaînement d'évènements menant à la mort des cellules. Il existe une troisième classe de mort dans laquelle se trouve l'autophagie.

4.1 La mort programmée : l'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire contrôlée génétiquement et très conservée par l'évolution. Elle possède un rôle prépondérant dans le développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie des tissus chez l'adulte.

L'apoptose peut être de type extrinsèque, elle est alors médiée par des récepteurs, ou intrinsèque lorsqu'elle est médiée par la mitochondrie ou par des voies de signalisation qui induisent une mort associée à la protéolyse et/ou aux activités nucléotiques. Elle se caractérise par une séquence très organisée d'évènements morphologiques (Kerr, Wyllie, and Currie 1972). Il y a d'abord une condensation du noyau et du cytoplasme avec des bourgeonnements de la membrane plasmique. Ensuite, les membranes se cassent et forment des corps apoptotiques en forme de grosses vésicules qui sont rapidement récupérées par les cellules voisines et les macrophages.

Les interactions et protéines responsables de son déclenchement ont été bien conservées. La drosophile est l'une des premières espèces dans laquelle ont été caractérisées toutes ces protéines. Chez la drosophile comme chez d'autres organismes dont les mammifères, il semblerait que l'induction de l'apoptose dans le cerveau adulte soit régulée et enclenchée par des signaux gliaux en ce qui concerne le cerveau.

4.1.1 Description de la voie extrinsèque

L'apoptose par voie extrinsèque est déclenchée par les récepteurs de mort. Il y a alors formation du DISC (*Death-inducible signalling complex*) qui va activer la pro-caspase 8 (Boldin et al. 1996; Muzio et al. 1996). La Caspase 8 active la pro-caspase 3 qui clive les protéines cibles et mène à l'apoptose. La caspase 8 peut aussi cliver Bid qui induit Bax et/ou Bak dans la membrane externe de la mitochondrie (Schmitz et al. 1999) ce qui fait que plusieurs protéines mitochondriales de l'espace intermembranaire dont le Cytochrome C s'échappent dans le cytosol, permettant la formation de l'apoptosome. Une fois formé, l'apoptosome active Apaf-1 (*apoptotic activating factor-1*) et la pro-caspase 9. L'activation de la caspase 9 active la caspase 3 (P. Li et al. 1997) qui est la caspase effectrice de l'apoptose.

4.1.2 Description de la voie intrinsèque

La voie intrinsèque est médiée par les mitochondries. Le signal de mort part des mitochondries de façon directe ou non ce qui résulte dans la formation de l'apoptosome. Cette mort cellulaire est contrôlée par les protéines de la famille des Bcl-1 (Cory and Adams 2002) qui régulent la libération du cytochrome c. Certains inhibiteurs de l'apoptose (IAPs) (Srinivasula et al. 2001) inhibent les caspases et Smac, un autre activateur mitochondrial des caspases (Du et al. 2000). Omi est un régulateur négatif des IAPs (Hegde et al. 2002). En plus de la voie dépendante des caspase, il pourrait y avoir une implication de mécanismes non dépendants des caspases comme la translocation des AIF (*apoptosis inducing factor*) et EndoG (Endonucléase G) des mitochondries vers le noyau (Susin et al. 1996; L. Y. Li, Luo, and Wang 2001). AIF peut alors se lier à la chromatine, qui se condense. Dans ce phénomène, le rôle de EndoG n'est pas clair. Granzine A (GrA) pourrait être également impliqué dans cette voie (Beresford et al. 2001; Fan et al. 2003). Une fois dans la cellule au niveau du cytosol, il induit une voie de cassure de l'ADN dépendante de GAAD (*GrA-activated DNase*). La voie intrinsèque inclut également la voie dépendante de la caspase 2. Lorsqu'elle est activée, elle induit des dommages à l'ADN qui induisent la libération du cyt c et la formation de l'apoptosome (Robertson et al. 2002; Lassus, Opitz-Araya, and Lazebnik 2002).

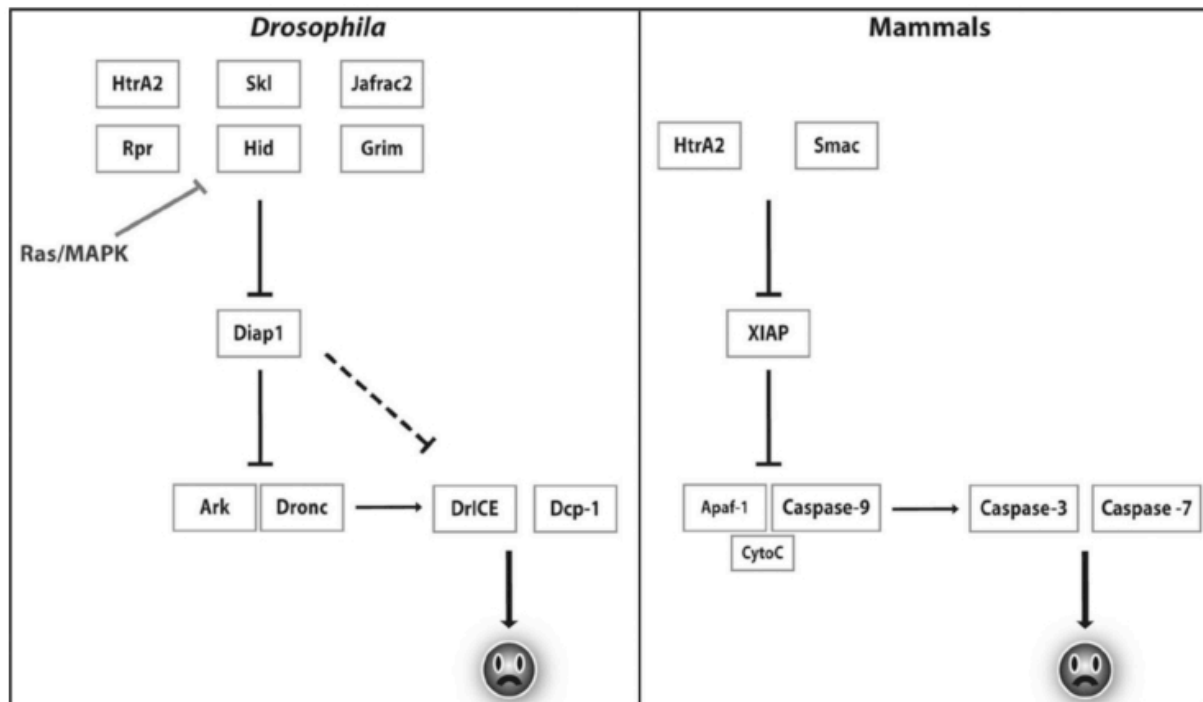


Figure 5 : Schéma de déclenchement de l'apoptose chez la drosophile et chez les mammifères.

Les voies ne sont pas très différentes entre drosophiles et mammifères. Les protéines Reaper (Rpr), Hid, Grim, Sickle, HtrA2/Omi et Jafrac2 sont des protéines pro-apoptotiques et sont régulées par des signaux de morts. Hid est inhibée par la signalisation Ras/MAPK. Les protéines Rpr, Hid et Grim libèrent la caspase initiateur Dronc de l'inhibition de Diap1. Dronc peut alors se lier avec Ark pour former l'apoptosome qui active les caspases effectrices Dcp-1 et DrICE, ce qui va déclencher le processus apoptotique par clivage de leurs nombreux substrats cellulaires. Chez les mammifères, Smac et HtrA2, libérés des mitochondries, déclenchent la mort cellulaire par liaison avec XIAP et libération des caspases initiateur comme la Caspase-9. La formation de l'apoptosome s'accompagne de la libération du cytochrome c (CytoC) et liaison avec Apaf1 ce qui permet de recruter et d'activer la Casp-9. Les caspases 3 et 7 sont ensuite activées et permettent les réactions apoptotiques (D. Xu et al. 2010).

Chez la drosophile, le processus apoptotique est assez bien caractérisé (Figure 5). On connaît une grande partie des acteurs protéiques qui permettent ou non le déclenchement de l'apoptose. L'une des principales voies apoptotique implique la libération du cytochrome c présent au niveau de la membrane mitochondriale. On trouve également ce que l'on appelle des protéines effectrices de la mort programmées qui sont DriCE et Dcp-1 des homologues de la Caspase-3 et Caspase-7.

4.2 La mort non-programmée : la nécrose

La nécrose correspond à un éclatement irréversible de la cellule. Il y a donc lyse de la cellule et la libération des constituants cellulaires, ce qui est responsable d'une inflammation du tissu alentour engendrée par le relargage des enzymes lysosomiales, dont bon nombre sont des enzymes hydrolytiques. On ne sait pas trop ce qui fait que la cellule enclenche la nécrose plutôt que l'apoptose mais cette « décision » dépend probablement de la nature et de l'ampleur du dommage cellulaire.

4.3 L'autophagie :

L'autophagie est un processus de mort cellulaire qui aurait évolué avant l'apoptose. Elle est beaucoup appliquée par les plantes et les champignons. On connaît mal les mécanismes de l'autophagie mais on sait qu'elle impliquerait des cysteines proteases, appelées aussi autophagines, qui seraient impliquées dans l'induction, la régulation et l'exécution de l'autophagie. On sait que des DAP kinases (death associated protein) et DRP-1 (DAP kinase death associated protein) de la famille des kinases sérine/thréonine dépendantes du Ca^{2+} /calmoduline, participeraient à la formation des vésicules autophagiques et des démembrants de la membrane pendant la mort cellulaire.

5 Agents oxydants : paraquat et roténone

Le paraquat et la roténone sont deux générateurs de stress oxydant majeur. Ce sont tous deux des pesticides qui ont été très largement utilisés par les agriculteurs. Alors que la roténone est un pesticide naturel car il est produit par des plantes, le paraquat est lui une molécule de synthèse. En plus de cette différence, leur mode d'action sur les cellules diffère complètement, ces différences seront énoncées dans les paragraphes suivants.

5.1 Le paraquat

5.1.1 Généralités

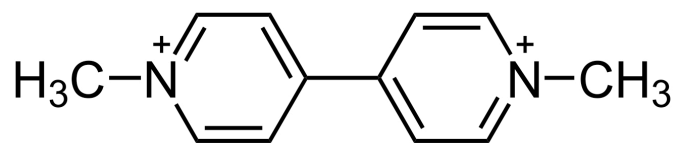


Figure 6 : Structure chimique du paraquat

Le paraquat (PQ) est un fort générateur de stress oxydatif. Comme énoncé plus haut, le paraquat a été fortement impliqué dans la maladie de Parkinson durant ces dernières décades. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une implication très présente de l'utilisation du paraquat dans les cas d'agriculteurs développant la MP. Le paraquat est une molécule faisant partie de la famille des diquats. Par sa structure moléculaire même, il ressemble fortement à la dopamine mais plus encore au MPTP, sous-produit de la fabrication de l'héroïne de synthèse, et qui fut montré comme impliqué dans le déclenchement de la MP. Cependant, contrairement au MPTP qui est très spécifique des neurones dopaminergiques car il est capable de pénétrer par le transporteur de la dopamine

et est connu pour être un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), le PQ n'a pas d'interlocuteur vraiment bien défini qui lui permette de rentrer dans les cellules. Cependant, de nombreuses études in vitro et in vivo montrent que le paraquat a un effet assez spécifique au niveau des neurones dopaminergiques aboutissant à des morts cellulaires par apoptose très souvent. Récemment, Rappold et coll. ont montré que le paraquat pourrait pénétrer spécifiquement dans les neurones dopaminergiques par le transporteur de la dopamine (Rappold et al. 2011).

Depuis 2007, le paraquat en tant que pesticide a été interdit par la communauté européenne (Anon.) du fait de sa forte corrélation avec le développement de la maladie de Parkinson montré par de nombreuses études étiologiques (Liou et al. 1997; R. C. Chen et al. 2001; Petrovitch et al. 2002; Dinis-Oliveira et al. 2006; Tanner et al. 2011). Il est utilisé dans plus de 120 pays dont une grande part dans les pays d'Asie (Anon.) où les paysans développent toujours largement des symptômes de type Parkinsoniens.

5.1.2 Mode d'action

Une fois dans les cellules, le paraquat est capable de générer un très fort stress oxydant par interaction avec divers partenaires biologiques ainsi que via la réaction de Fenton. Les mécanismes sous-tendant son implication dans la mort des neurones dopaminergiques ne sont pourtant pas encore élucidés.

Le paraquat réagit avec le NADH membranaire dans une boucle rédox pour former le NAD⁺ et certaines espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont rentrer dans la réaction de Fenton pour former l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Dans ce même laps de temps, le paraquat est capable de se régénérer pour recommencer sa boucle avec le NADH. Le paraquat est une molécule extrêmement stable. Bien que l'organisme soit capable de s'en débarrasser de l'ordre de 90% toutes les 24 heures, les 10% restant sont suffisant pour provoquer un fort stress oxydatif dans les cellules.

Certaines études récentes ont montré que le paraquat serait, tout comme le MPTP, un inhibiteur du complexe I de la CRM. Pourtant, ceci serait sujet à controverse car d'autres études suggèrent que le temps nécessaire au paraquat pour induire son stress serait supérieur au temps nécessaire pour agir sur d'autres organites tels que le réticulum endoplasmique.

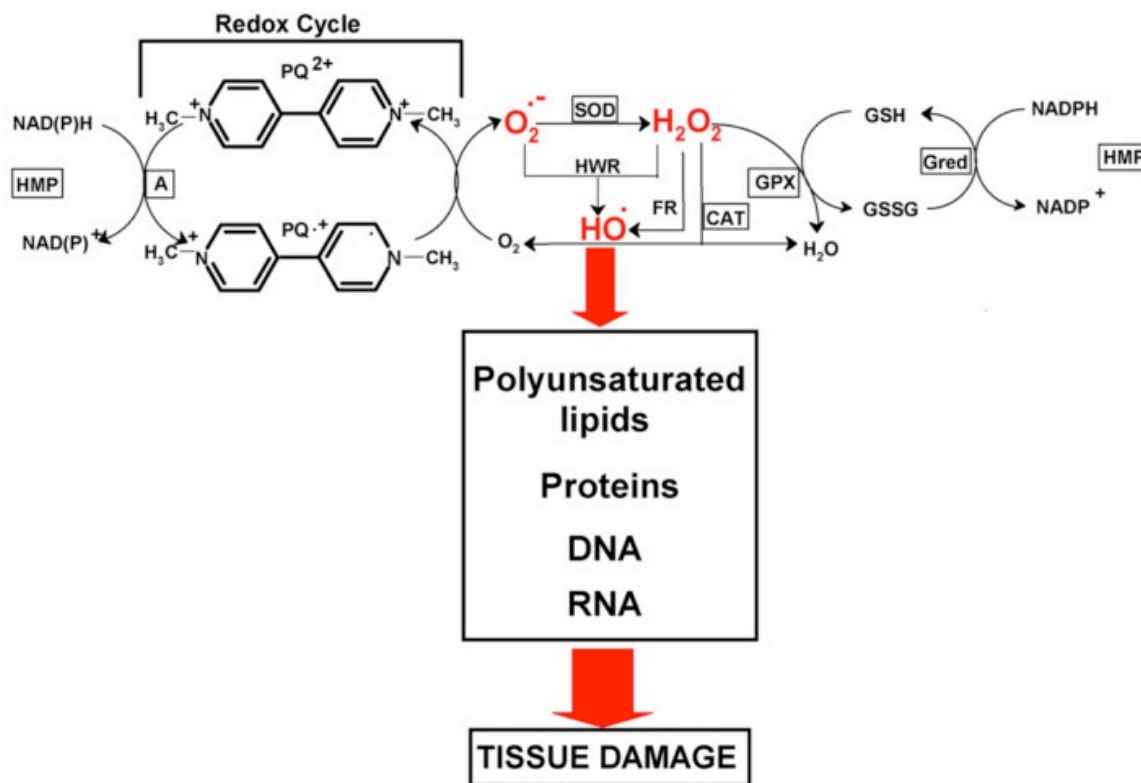


Figure 7 : Schéma représentatif du mode d'action du paraquat.

Le paraquat est réduit par le NADPH et réoxydé par l'O₂ pour générer l'ion superoxyde (O₂^{•-}) dans une boucle redox. Il y a ensuite une cascade de réactions qui produit d'autres EROs comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyde (HO•) qui ont des conséquences néfastes sur les composants de la cellule. (SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; Gred, glutathione reductase; PQ²⁺, paraquat; PQ^{•+}, paraquat cation radical; HMP, hexose monophosphate pathway; FR, Fenton reaction; HWR, Haber-Weiss reaction) (Dinis-Oliveira et al. 2006).

5.1.3 La réaction de Fenton :

Observée en 1894, la réaction de Fenton fait intervenir une caractéristique du Fer. En effet, celui-ci réagit avec plus grande facilité en réaction avec l' H_2O_2 qu'il ne peut se lier avec une SOD. Cette réaction explique pourquoi le Fer a été remplacé dans l'évolution par du Mn dans les réactions faisant intervenir les SOD. La réaction de Fenton consiste en des échanges de protons entre les réactifs de l'oxygène et les ions fer.

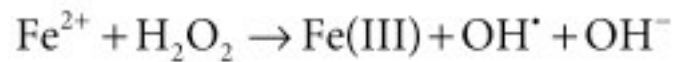


Figure 8 : Formule de la réaction de Fenton.

5.2 La roténone

La roténone est un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il s'agit d'un pesticide naturel produit par des plantes. L'inhibition du complexe I de la CRM résulte dans l'augmentation du stress oxydant provenant des mitochondries. Comme nous l'avons vu dans la première partie, les mitochondries sont considérées comme étant l'un des sièges principaux de la génération du stress oxydatif. De nombreuses études ont été capables de faire le lien entre l'exposition à la roténone et le développement des symptômes de la MP aussi bien chez l'homme qu'au laboratoire (Tanner et al. 2011; Abbott et al. 2001; Braak et al. 2006; Drolet et al. 2009; J. G. Greene, Noorian, and Srinivasan 2009; Pan-Montojo et al. 2010). Elle est un pesticide naturel, produit par certaines plantes tropicales. La roténone est très sensible à l'exposition à la lumière mais est également très rapidement détruite dans le sol et l'eau.

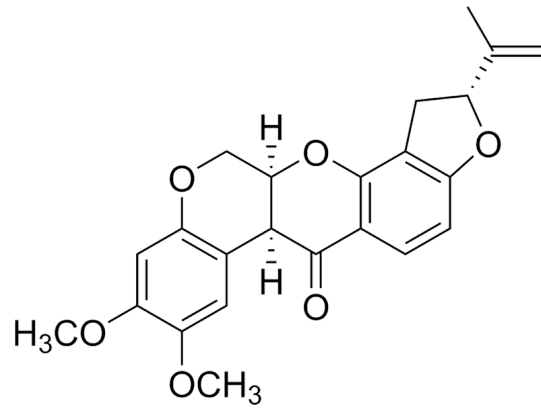


Figure 9 : Formule chimique de la roténone.

La roténone est très lipophile, elle n'a donc aucun problème pour passer tout type de barrière, ainsi que les membrane des cellules. Une fois dans les neurones dopaminergiques, elle agit de la même manière que le MPTP par inhibition du complexe I de la CRM, ce qui aboutit à une accumulation d'ERO, inhibant l'effet détoxifiant du NADH couplé au complexe I (Schuler and Casida 2001). Il a été également montré que la roténone est capable d'inhiber la formation des microtubules à partir des molécules de tubuline.

Partie II : Stress oxydant et maladie de Parkinson

1 Présentation de la maladie

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative qui touche globalement les plus de 45 ans. Les formes les plus précoces de la MP concernent 10% des patients avec un âge inférieur à 40 ans (Poorkaj et al. 2004).

Elle se manifeste par une série de symptômes moteurs spécifiques : des tremblements des extrémités des membres au repos, une rigidité musculaire et une akinésie (bradykinésie : rareté et lenteur des mouvements, visage figé et perturbations de la marche caractéristiques). Cependant, le patient souffre aussi plus tardivement de troubles du sommeil, de la parole et de l'écriture, de dépression et de symptômes cognitifs. De plus, la maladie peut à terme évoluer chez le sujet âgé vers des cas de démence. Il est à noter que des traitements symptomatiques permettent de soigner temporairement les personnes atteintes de la MP, mais pas de les guérir à l'heure actuelle.

La MP se caractérise par la perte sélective et progressive des neurones dopaminergiques de la substantia nigra pars compacta (SNpc) (Figure 10). La SNpc fait partie des noyaux des ganglions de la base, noyaux sous-corticaux qui contrôlent des comportements moteurs, affectifs et cognitifs. Les premiers symptômes de la MP se déclenchent lorsqu'environ 70 % des neurones dopaminergiques ont disparu. Il est toujours trop tard pour intervenir. Cette perte des neurones DA apparaît *post-mortem* sur des patients atteints de la MP (Figure 10). En effet, on peut clairement identifier une perte de la coloration due à la neuromélanine, pigment naturellement présent dans les neurones dopaminergiques de la SNpc, en comparaison avec la SNpc des personnes non atteintes. La MP s'accompagne très fréquemment d'une dégénérescence de neurones présents dans d'autres noyaux tels que ceux de l'hypothalamus, mais les proportions sont bien moindre comparées à la SNpc qui

voit sa population de neurones DA dramatiquement chuter. Les neurones DA restant possèdent des inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy (CL). Les CLs sont des inclusions contenant des filaments de protéines contenant l' α -synucléine, l'ubiquitine et d'autres protéines impliquées dans la pathogenèse de la MP. Outre les neurones dopaminergiques de la substance noire (Muentner et al. 1998; Gwinn et al. 2011), les CL se retrouvent également dans des zones corticales en contexte de cas de démences (McKeith et al. 2003).

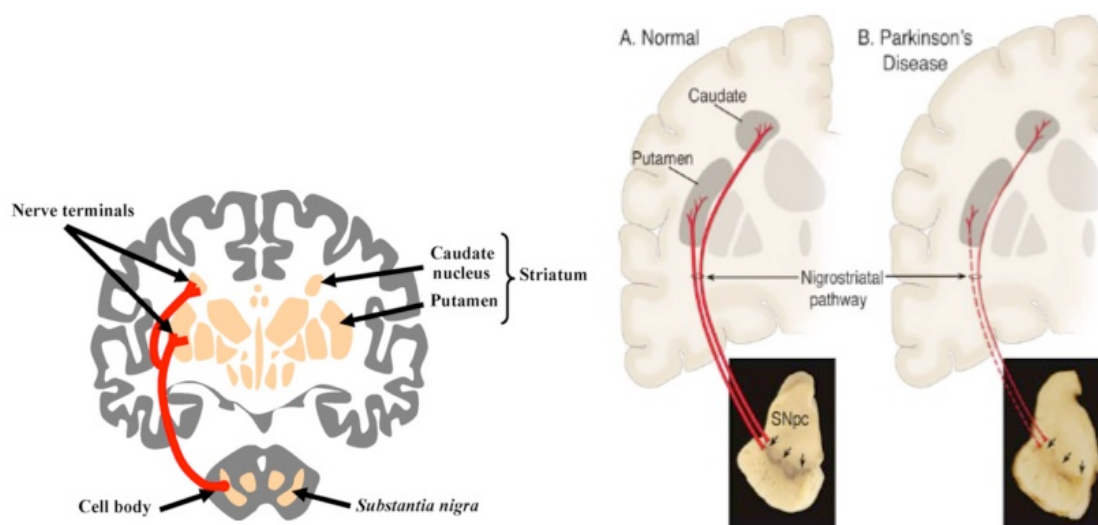


Figure 10 : Schéma montrant les conséquences de la dégénérescence des neurones dopaminergiques sur les connexions au sein du striatum (d'après Dinis-Oliveira et al., 2006).

2 Les différentes causes de la maladie :

Comme dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, il n'y a pas une seule cause responsable de la MP et plusieurs facteurs mènent au développement de cette maladie. Ainsi, des mutations de différents gènes ont été associés au développement de la MP, tels que l'*SNCA*, *parkin*, *Irrk2*, *UCHL1*, *Pink1*... Mais l'exposition à des substances chimiques a également été impliquée, des toxines comme le MPTP ou des

facteurs environnementaux qui sont en général des pesticides comme le paraquat, la roténone ou le maneb. Le MPTP est un produit dérivé de la synthèse d'une drogue opiacée (voir ci-dessous).

2.1 Facteurs génétiques

Dans moins de 10% des cas, le développement de la MP est lié à des facteurs génétiques qui peuvent être variables allant de la présence de mutations (récessives ou dominantes) dans certains gènes à la présence de multiples copies de gènes. Les gènes causant la MP sont nommés PARK et classés selon une nomenclature allant actuellement de 1 à 18 (Tableau 1) (Corti, Lesage, and Brice 2011).

PARK Loci	Gene	Map Position	Inheritance	Disease Onset	Mutations
<i>PD-associated loci and genes with conclusive evidence</i>					
PARK1/PARK4	SNCA	4q21	Dominant; rarely sporadic	Early onset	A30P, E46K, A53T genomic duplications/triplications
PARK8	LRRK2	12q12	Dominant; sporadic	Late onset	>80 Missense variants, >7 of them pathogenic, including the common G2019S
PARK2	parkin	6q25-q27	Recessive; sporadic	Juvenile; early onset	Approximately 170 mutations (point mutations, exonic rearrangements)
PARK6	PINK1	1p35-p36	Recessive	Early onset	Approximately 50 point mutations, rare large deletions
PARK7	DJ-1	1p36	Recessive	Early onset	Approximately 15 point mutations and large deletions
PARK9	ATP13A2	1p36	Recessive	Juvenile KRS, early-onset PD	>5 Point mutations
<i>PD-associated loci and genes with unknown relevance</i>					
PARK3	Unknown	2p13	Dominant	Late onset	Not identified
PARK5	UCHL1	4p14	Dominant	Late onset	One mutation in a single PD sibling pair
PARK10	Unknown	1p32	Unclear	Late onset	Not identified
PARK11	GIGYF2	2q36-q37	Dominant	Late onset	7 Missense variants
PARK12	Unknown	Xq21-q25	Unclear	Late onset	Not identified
PARK13	Ormi/HTRA2	2p13	Unclear	Late onset	2 Missense variants
PARK16	Unknown	1q32	Unclear	Unclear	Not identified
<i>Loci and genes associated with atypical parkinsonism</i>					
PARK14	PLA2G6	22q12-q13	Recessive	Juvenile levodopa-responsive dystonia-parkinsonism	2 Missense mutations
PARK15	FBX07	22q12-q13	Recessive	Early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome	3 Point mutations
<i>PD-associated genes proposed by candidate gene approach</i>					
Not assigned	SCA2	12q24.1	Dominant for SCA2	Unclear	Low-range interrupted CAG expansions in SCA2
Not assigned	GBA	1q21	Recessive for GD	Unclear	

Tableau 1: Tableau récapitulatif des 18 gènes impliqués dans la MP (Corti, Lesage and Brice 2011).

2.1.1 PARK1/4 : SNCA

Le gène *SNCA*, qui code l' α -synucléine (α -syn), est le premier facteur génétique identifié comme pouvant provoquer une forme dominante de la MP. Polymeropoulos et coll. découvrirent en 1996 des mutations de ce gène dans une famille Italienne présentant une forme héréditaire de la MP avec corps de Lewy (Polymeropoulos et al. 1996). Le gène *SNCA* code pour une protéine d'environ 15 kDa (140 acides aminés) qui fait partie d'une famille de 3 protéines présentes chez les humains et les rongeurs présentant un fort taux d'homologies entre elles : l' α -synucléine, la β -synucléine et la γ -synucléine (Clayton and George 1998). L' α -syn possède une caractéristique propre : la capacité de s'aggréger et de former des filaments qui peuvent dans certains cas être insolubles (Giasson et al. 2001). Plusieurs anomalies de ce gène peuvent induire le développement de la MP : des mutations ponctuelles du gène (A53T, A30P et E46K) (Figure 11) et/ou des duplications/triplications du locus complet entraînant une surexpression de la protéine native (Fuchs et al. 2007). La mutation ponctuelle A53T est la plus représentée dans les formes héréditaires de la MP, elle est en effet présente dans de nombreuses familles, alors que les deux autres mutations ponctuelles A30P et E46K ont été trouvées chacune dans une famille différente (Krüger et al. 1998; Zarranz et al. 2004).

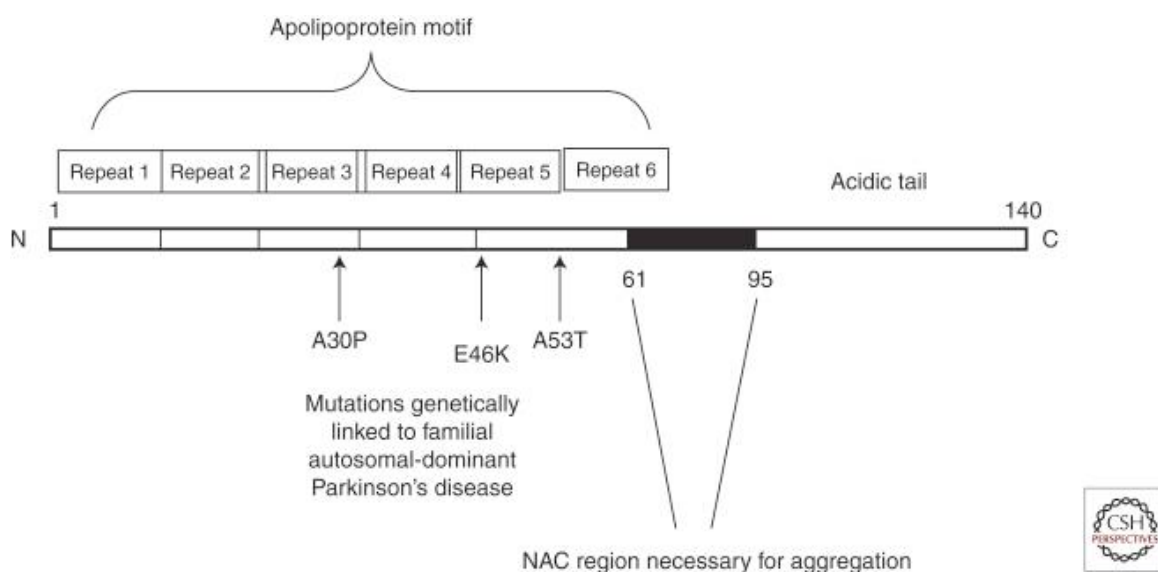


Figure 11 : Représentation de l' α -syn montrant les différents domaines de la protéine et localisant les mutations ponctuelles connues de la MP.

La protéine de l' α -syn comporte trois régions principales. En N-terminal, on trouve des motifs qui formeraient des hélices amphiphiles pouvant se lier aux membranes. La région NAC (non-Abéta component) est une région hydrophobe centrale. La région en C-terminal est très fortement chargée négativement et n'aurait pas de vraie structure. Les trois mutations existantes de la MP se trouvent au niveau des motifs en N-terminal (d'après Stefanis, 2012).

L' α -syn est impliquée dans un ensemble de maladies que l'on nomme « synucléinopathies » et qui rassemblent, outre la MP, des parkinsonismes avec des démences ou encore des démences avec des corps de Lewy (Uversky and Fink 2002). De plus, il y a un lien connu entre le nombre de copies du gène et la sévérité des symptômes de la MP (Ibáñez et al. 2009; Ikeda, Daughters, and Ranum 2008; Ikeuchi et al. 2008; D W Miller et al. 2004).

L' α -syn est le composant majoritaire des corps de Lewy (CL) (lewy body ou lewy neurites lorsqu'il s'agit d'agrégats filamenteux). Les mutations ainsi que les multicopies du gène favorisent l'aggrégation de la protéine. La mutation A30P diminue la fréquence d'association de l' α -syn avec les membranes lipidiques (Jensen et al. 1998; Bussell and Eliezer 2004), favorisant ainsi l'aggrégation. En effet, α -syn possède dans son domaine central de la protéine (le domaine NAC), un domaine amyloïdogène qui s'agrège facilement et forme des structures oligomériques intermédiaires, des protofibrilles et jusqu'à des polymères de fibrilles insolubles (Figure 12) (Giasson et al. 2001).

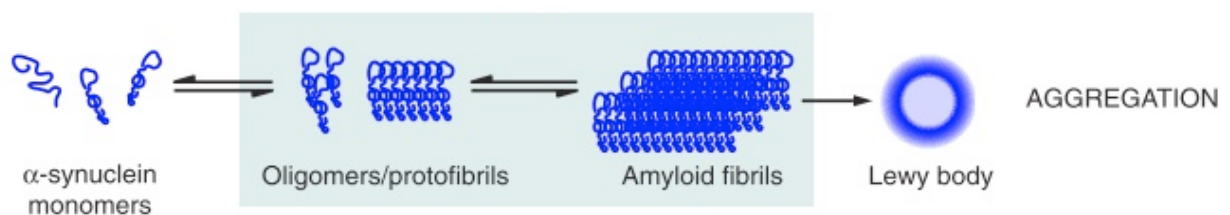


Figure 12 : Schéma représentatif de l'aggrégation des filaments de l'a-syn (d'après Corti, Lesage et Brice, 2011).

Très exprimée dans le système nerveux de façon native, l' α -syn se trouve plutôt au niveau du neuropile, et plus précisément des synapses (Kahle 2008). De nombreux travaux semblent indiquer un rôle de l' α -syn dans la transmission synaptique, cependant les fonctions de l' α -syn ne sont pas encore établies avec précision. Majoritairement, elle pourrait participer au recyclage des vésicules dans le compartiment présynaptique (Abeliovich et al. 2000; Cabin et al. 2002; Nemani et al. 2010; Yavich et al. 2004), à l'assemblage du complexe SNARE (Chandra et al. 2005; Burré et al. 2010) et avoir un rôle prépondérant dans la libération des neurotransmetteurs (Abeliovich et al. 2000; Murphy et al. 2000; Cabin et al. 2002; Larsen et al. 2006; Fortin et al. 2005). Au niveau des neurones dopaminergiques plus particulièrement, des travaux de Sidhu et coll., en 2004, ont montré que l' α -syn régule de façon négative l'activité de la tyrosine hydroxylase (l'enzyme limitante dans le processus de biosynthèse de la dopamine) et du transporteur de la dopamine (Sidhu, Wersinger, and Vernier 2004). Des études menées sur des souris knock-out (KO) pour l' α -syn ont montré que l'absence de cette protéine n'a que très peu d'effet sur les souris mis à part, dans certaines conditions, une augmentation de libération de dopamine au niveau du striatum (Abeliovich et al. 2000). Par contre, le KO des 3 membres de la famille à savoir α , β et γ , permet d'obtenir un phénotype clair présentant des altérations de la morphologie des axones en fonction de l'âge, un dysfonctionnement neuronal et une diminution de la survie (Greten-Harrison et al. 2010), suggérant l'existence d'une redondance fonctionnelle entre ces trois protéines. Le KO de l' α -syn a aussi été décrit comme ayant un effet protecteur contre le MPTP (Klivenyi et al. 2006).

2.1.2 PARK2 : parkin :

Les pathologies associées à un défaut du gène *parkin* (*PARK2*) représentent environ 2% des cas de la MP dans le monde et 20% des formes juvéniles touchant les personnes de moins de 40 ans. Les mutations de la parkine sont associées à une forme autosomique récessive de la maladie, avec des phénotypes similaires aux formes sporadiques mais sans apparition de corps de Lewy.

Le gène *PARK2* est très grand avec une taille de 1.35 Mb (12 fois plus que le gène *SNCA*) et code pour la protéine parkine. Les patients présentent des aberrations qui vont de multiples mutations (170 ont été répertoriées jusqu'à présent) à des délétions importantes ou des multiplications, petites délétions ou insertions. Ils sont également porteurs de réarrangements d'exons difficilement identifiables. Les réarrangements génomiques peuvent aller jusqu'à des délétions touchant le gène associé *PACRG* (*parkin co-regulated gene*), les phénotypes restant similaires à ceux de la MP.

La parkine possède un domaine *N-terminal ubiquitin-like* (Ubl) suivi par un domaine de liaison du zinc et un domaine *C-terminal RING1–In-between-ring (IBR)–RING2* qui en fait un membre de la famille des *E3 ubiquitine ligases*, enzymes qui permettent le transfert d'un groupement ubiquitine activé à une protéine substrat. Une telle modification post-traductionnelle par « ubiquitylation » peut conduire à la dégradation par le protéasome de la protéine ciblée. On a donc émis l'hypothèse que les mutations du gène *parkin* pourraient inactiver cette activité *E3 ubiquitin ligase* et ainsi diminuer l'efficacité du protéasome envers la dégradation de certaines protéines substrats de la parkine. Cependant, des expériences *in vitro* ont montré que pour certaines mutations pathogènes, il n'y a pas d'altération du mécanisme d'ubiquitylation (Hampe et al. 2006; Matsuda et al. 2006) mais plutôt une diminution de la solubilité de la parkine, entraînant une tendance significative à l'aggrégation de celle-ci (Corti and Brice 2007). La parkine est également associée au maintien d'une bonne morphologie des mitochondries (Darios et al. 2003). Elle est également fortement impliquée dans les phénomènes de dynamique mitochondriales et de mitophagie.

La parkine a été identifiée comme étant un facteur de transcription, en effet, elle possède un domaine de liaison à l'ADN et est également capable d'inhiber l'expression de certains gènes activés par des stimuli pro-apoptotiques. Il s'agit également d'un répresseur transcriptionnel de p53, un facteur pro-apoptotique, cette inhibition se ferait par une interaction directe entre la parkine et le promoteur de p53 (Cristine Alves da Costa et al. 2009; Cristine Alves da Costa and Checler 2010).

2.1.3 PARK6 : Pink1 :

Pink1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) est un facteur suppresseur de tumeur comprenant un motif MTS (*mitochondrial targeting sequence*), une région transmembranaire putative et un domaine sérine/thréonine kinase. Des mutations dans son gène induisent une forme autosomique récessive juvénile de la MP (Valente et al. 2004). Les mutations homozygotes ou perte de fonction hétérozygotes causent les seconds cas les plus fréquents de MP (Deas, Plun-Favreau, and Wood 2009; Nuytemans et al. 2010). Toutes ces mutations ont globalement le même effet sur la protéine et la déstabilisent ou diminuent l'activité de la kinase (Beilina et al. 2005). Pink1 permet d'augmenter la résistance au stress cellulaire et serait impliqué dans le maintien de l'homéostasie en condition de stress. La surexpression de Pink1 protège les cellules de la mort induite par des toxines. A l'inverse, son absence augmente la vulnérabilité de celles-ci (Deas, Plun-Favreau, and Wood 2009).

2.1.4 PARK7 : DJ-1

DJ-1 est une protéine, codée par le gène *PARK7*, qui fait partie de la famille des ThiJ/Pfp1, molécules de type chaperones induites lors d'un stress oxydant. Des mutations du gène *PARK7* causent des formes autosomiques récessives de la MP et environ 1% des formes précoces de la maladie. Bonifati et coll. identifèrent en 2003 des mutations correspondant à des larges délétions homozygotes ou des mutations ponctuelles chez deux familles (Bonifati et al. 2003).

DJ-1 est un véritable senseur du stress oxydant. Il possède un résidu cystéine en position 106 qui, en cas de stress, prend un état d'acide sulfinique (-SOOH). DJ-1 est alors adressé du cytoplasme à la membrane mitochondriale et cette acidification jouerait un rôle essentiel dans la neuroprotection (Canet-Avilés et al. 2004; Blackinton et al. 2009). La mutation L166P identifiée dans les cas de MP déstabilise la protéine, favorisant la dégradation de celle-ci par le protéasome et limitant de fait son action protectrice (David W Miller et al. 2003; Moore et al. 2003; Taira et al. 2004).

2.1.5 PARK8 : LRRK2:

Le gène *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase 2*) code pour une enzyme, la dardarine, qui comprend de nombreux domaine de liaison à d'autres protéines ainsi que des domaines kinase et GTPase. Des mutations de ce gène sont responsables de 10% des formes autosomiques dominantes de la MP. On dénombre 80 variants différents pour ce gènes qui sont en globalité des variants entraînant un gain de fonction de la protéine. Parmi toutes les mutations connues, 7 sont considérées comme pathologiques (Aasly et al. 2010; Healy et al. 2008) ; ce sont toutes des mutations présentes au niveau de régions importantes pour la fonction de la protéine, en particulier la mutation G2019S dans le domaine kinase. La dardarine semble avoir un rôle clef dans la MP, surtout par sa fonction kinase. En effet, la phosphorylation anormale des protéines ainsi que leur accumulation semble être un facteur important dans le déclenchement des maladies neurodégénératives. Pour les mutations provoquant un gain de fonction, l'activité kinase augmenterait (Greggio and Cookson 2009; Lu and Tan 2008). Des travaux ont également montré que des mutants de la dardarine sont toxiques pour les neurones, mais l'implication de l'activité de la kinase dans cette toxicité cellulaire est encore sujet à débat (Greggio et al. 2006; Smith et al. 2006; Rudenko et al. 2012).

2.1.6 PARK9 : ATP13A2

Le gène *ATP13A2* code pour une protéine transmembranaire lysosomale avec une activité ATPase putative. Cette protéine a été associée au syndrome de Kufor-Rakeb, qui est une forme atypique et juvénile de parkinsonisme. Des travaux ont montré que lorsqu'elle est mutée, la protéine ATP13A2 s'accumule dans le reticulum endoplasmique et est dégradée par le protéasome (Ramirez et al. 2006). Sa fonction reste mal connue, mais son implication dans la MP semble générale, car on trouve une surexpression d'un facteur 10 de ce gène chez les patients atteints de formes sporadiques de la MP (Ramirez et al. 2006). Des études récentes semblent indiquer que l'absence de cette protéine entraîne un dysfonctionnement des lysosomes pouvant provoquer la MP, qui pourraient mener à l'accumulation anormale de protéines telles que l' α -syn (Usenovic et al. 2012; Dehay et al. 2012). ATP13A2 a également

été impliquée dans les processus de résistance à la cytotoxicité du manganèse (J. Tan et al. 2011).

2.1.7 Glucocerebrosidase :

Plus de 300 mutations dans le gène codant pour la glucocerebrosidase (GBA) ont été identifiées à l'heure actuelle et causent la maladie de Gaucher (MG) (DePaolo et al. 2009). Il s'agit de mutations ponctuelles, des insertions, des délétions mais aussi, des allèles issus de la recombinaison du gène ou du gène de la GBA avec le gène voisin (Hruska et al. 2008). GBA est une enzyme qui permet la conversion du glycolipide glucocerebroside en glucose et en ceramide. Les mutations sont distribuées sur la région codante mais plus souvent au niveau de la partie C-terminale du gène. La première indication d'une implication de la GBA dans la MP a été donnée à la suite d'une autopsie de patients. Les patients atteints de la MP présentaient une importante fréquence de mutations de GBA (Eblan, Walker, and Sidransky 2005; Lwin et al. 2004). De plus, les patients atteints de la MG développent des symptômes de type parkinsoniens. Ainsi, il y aurait plus de 5000 patients présentant également une atteinte de la GBA (Neudorfer et al. 1996; Tayebi et al. 2001; Goker-Alpan et al. 2004; Aharon-Peretz, Rosenbaum, and Gershoni-Baruch 2004; Lwin et al. 2004; L. N. Clark et al. 2007; Gan-Or et al. 2008; Sidransky et al. 2009). Les mutations les plus communes rencontrées également dans la MP sont N370S et L444P (Shulman, De Jager, and Feany 2011).

2.2 Facteurs environnementaux

2.2.1 MPTP :

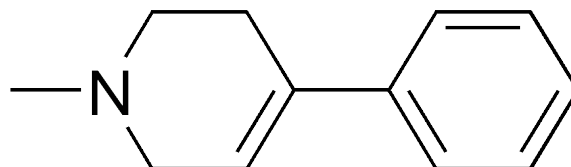


Figure 13 : Représentation de la formule du MPTP

Au début des années 80, il a été découvert que l'intoxication par le MPTP (N-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), un sous-produit obtenu accidentellement lors de la synthèse d'une drogue opiacée analogue à la morphine, entraînait des symptômes irréversibles semblables à ceux de la MP. En effet des patients ayant été exposés à cette neurotoxine développaient les symptômes moteurs de la maladie ainsi que la perte sélective des neurones dopaminergiques. Les études ont montrées que le MPTP est une toxine spécifique des neurones dopaminergiques. Le MPTP est capable de passer la barrière hémato-encéphalique, est transformé en MPP+ par les astrocytes, qui est ensuite capté par le transporteur de la dopamine dans les neurones dopaminergiques. Une fois dans les neurones, cette drogue s'attaque aux mitochondries en créant spécifiquement des dysfonctionnements de la CRM et en générant ainsi un important stress oxydant. Le MPTP pourrait également inhiber les fonctions mitochondriales en générant des radicaux libres comme l'oxide nitrique (Schapira 2011).

2.2.2 Roténone :

C'est en 1985 que Heikkila et coll. furent les premiers à constater que la roténone est capable de tuer les neurones dopaminergiques (Heikkila et al. 1985). D'autres expériences plus tardives montrèrent qu'à des taux similaires à ceux observés chez les patients atteints de la MP, la roténone pouvait tuer sélectivement les neurones de la substance noire (Betarbet et al. 2000) et même mener à des inclusions cytoplasmiques comparables aux corps de Lewy chez des modèles animaux. La roténone étant un inhibiteur bien connu du complexe I de la CRM. Ces découvertes attirèrent également l'attention sur l'implication des mitochondries dans la mort des neurones DA chez les patients atteints de la MP. Suite à ces modèles expérimentaux, les études épidémiologiques se multiplièrent et confirmèrent l'implication de ce pesticide dans la pathogenèse de la MP (Hancock et al. 2008; Dhillon et al. 2008).

L'incidence de la MP causée par la roténone est très faible du fait de ses propriétés chimiques. Cependant, des expériences en laboratoires montrent qu'une exposition chronique à ce pesticide mène à des dégénérescences dopaminergiques ainsi que des

symptômes similaires à ceux de la MP (Coulom and Birman 2004; Henchcliffe and Beal 2008).

2.2.3 Paraquat :

Une étude de Liou et coll., 1997, montra pour la première fois sur une population de 120 personnes à Taiwan, l'implication du paraquat dans le développement de la MP (Liou et al. 1997). Le PQ est un pesticide largement utilisé à Taiwan. Les études ont montré une forte corrélation entre les doses d'exposition au PQ chez les agriculteurs et le taux de développement de la MP. En effet, elles ont montré que les personnes exposées depuis plus de 20 ans à des doses de pesticides assez importantes développaient plus facilement la MP que des agriculteurs exposés depuis moins longtemps. La même relation a été trouvée entre les doses utilisées et le développement de la MP (Tanner et al. 2011).

3 Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondrial dans la MP :

L'hypothèse d'une causalité mitochondriale dans la MP est apparue à partir des travaux sur le MPTP qui ont montré qu'une fois dans les neurones dopaminergiques sous forme de MPP+, celui-ci est capable d'induire une inhibition du complexe I de la CRM (Langston et al. 1984; Markey et al. 1985; Haass 2010), ce qui entraîne du stress oxydatif, une déplétion en ATP et une mort cellulaire par apoptose. Des recherches consécutives à ces travaux ont montré qu'il existe effectivement un déficit du complexe I de la CRM mitochondriale dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, mais que ce défaut reste modéré (Janetzky et al. 1994). D'autres études ont cependant montré qu'il n'existe pas de mutations de l'ADN mitochondrial chez les patients atteints de la MP (Gu et al., 1998, Aomi et al., 2001, Miller et al., 1996), mais qu'on peut parfois observer une perte de l'ADN mitochondrial des neurones dopaminergiques spécifique de la substance noire en fonction de l'âge (Bender et al. 2006; Kraytsberg et al. 2006), ce qui expliquerait la spécificité de la vulnérabilité de ces neurones. Les plus forts arguments en faveur d'une implication des

mitochondries dans la MP viennent de ce que de nombreux gènes, peut-être tous impliqués dans la MP ont au moins en partie une localisation mitochondriale (Schapira and Gegg 2011).

C'est le cas par exemple des protéines parkine et Pink1. Des études à la fois chez les drosophiles et les mammifères ont montré qu'il existe une interaction entre la parkine et Pink1 qui semble essentielle à l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries (Exner et al. 2007), tant sur le plan du contrôle qualité de celles ci que sur le plan de la régulation de la dynamique mitochondriale (Ashrafi and Schwarz 2012). Les mitochondries sont des organites hautement dynamiques en terme de forme, de taille et de distribution cellulaire (Detmer and Chan 2007). La dynamique mitochondriale consiste en des fusions et divisions de mitochondries, mais également au mouvement de celles ci le long du cytosquelette. Les mitochondries sont organisées en réseaux. Ce réseau et ses effets sur les mitochondries sont un ensemble très conservé par l'évolution qui est essentiel dans de nombreux évènements cellulaires tels que la bioénergétique, les voies de contrôle-qualité et la régulation de la mort et de la viabilité cellulaire (Benard and Karbowski 2009; Soubannier and McBride 2009). Pink1 interagit avec des protéines mitochondriales telles que les protéines Miro, des GTPases qui interviennent dans la transport antérograde des mitochondries dans l'axone par interaction avec la kinésine 1 (Weihofen et al. 2009; Boldogh and Pon 2007; Frederick and Shaw 2007) ou encore la mitofiline, présente à la membrane interne des mitochondries (John et al. 2005) qui participe au contrôle de la morphologie des crêtes mitochondriales. Dans ces fonctions, la parkine paraît souvent agir en aval de Pink1. Concernant la dynamique mitochondriale, on connaît autant chez les drosophiles que chez les mammifères, les acteurs protéiques, Mfn et OPA1 chez la drosophile (Deng et al. 2008) et Drp1, Fis1 et Mtp18 chez les mammifères. Les études menées chez ces différents modèles semblent indiquer un rôle prépondérant du couple parkine/Pink1 sur la quantité et l'activité de ces protéines. Les mutations de Pink1 ou de Parkine induisent une fragmentation plus importante du réseau mitochondrial et une baisse de la production d'ATP (Cui et al. 2010; Dagda et al. 2009; Exner et al. 2007; Lutz et al. 2009; Sandebring et al. 2009; X. Wang et al. 2011; Weihofen et al. 2009). Cependant, l'absence de ces deux gènes ne provoquent

pas un phénotype plus exacerbé, en accord avec le fait que la Parkine et Pink1 se trouvent dans la même voie (Schapira 2008).

4 Les traitements :

Les traitements de la MP visent actuellement à soulager les patients des symptômes délétères de la maladie, car il n'existe pas de traitement curatif. Les traitements se décomposent en plusieurs types : les médicaments visant à traiter les symptômes moteurs et/ou non moteurs, les traitements chirurgicaux, et les autres traitements non pharmacologiques ou invasifs.

4.1 Traitements de type médicament :

Parmi ces traitements, la levodopa (L-DOPA), précurseur de la DA, est un élément clef. Son effet sur les symptômes parkinsoniens fut en premier décrit par Carlsson et ses coll. en 1957, débutant l'utilisation d'injection de L-DOPA dans les traitements de la MP. Cette drogue reste la plus utilisée pour traiter les symptômes moteurs dans les premiers temps de la maladie. Cependant, elle induit très vite des dysfonctionnements moteurs (environ 4-6 ans après le début de la prise) avec l'apparition de dyskinésies. Le traitement est souvent pris avec co-administration de carbidopa, un inhibiteur de la dopa décarboxylase qui empêche la conversion en périphérie de la L-DOPA en dopamine et permet de limiter des effets secondaires liés à cette conversion. Les agonistes dopaminergiques sont aussi souvent utilisés, car ils ont un effet très bénéfique sur les effets précoces du développement de la MP, même s'ils restent moins efficaces que la L-DOPA et entraînent de sévères problèmes de comportement à caractère obsessionnel et compulsif (Kelley, Duker, and Chiu 2012). Les agonistes dopaminergiques les plus utilisés sont la Sélégiline et la Rasagiline. D'autres

médicaments pouvant être ajoutés pour traiter les symptômes non moteurs associés (insomnies, somnolences, douleurs...).

4.2 Traitements chirurgicaux :

Ces traitements se caractérisent par des chirurgies invasives au niveau du cerveau. Deux types de chirurgie sont effectuées : la destruction de structures cérébrales à risque dans la MP et la stimulation cérébrale profonde.

La stimulation cérébrale profonde fait intervenir l'implantation d'électrodes dans des noyaux sous-corticaux faisant partie des ganglions de la base comme le noyau sous-thalamique ou le *globus pallidus*. Chaque électrode est reliée à un boîtier présent en sous-cutané au niveau du torse (Figure 14) qui permet de générer une stimulation électrique à haute fréquence (SHF) au niveau des zones ciblées.

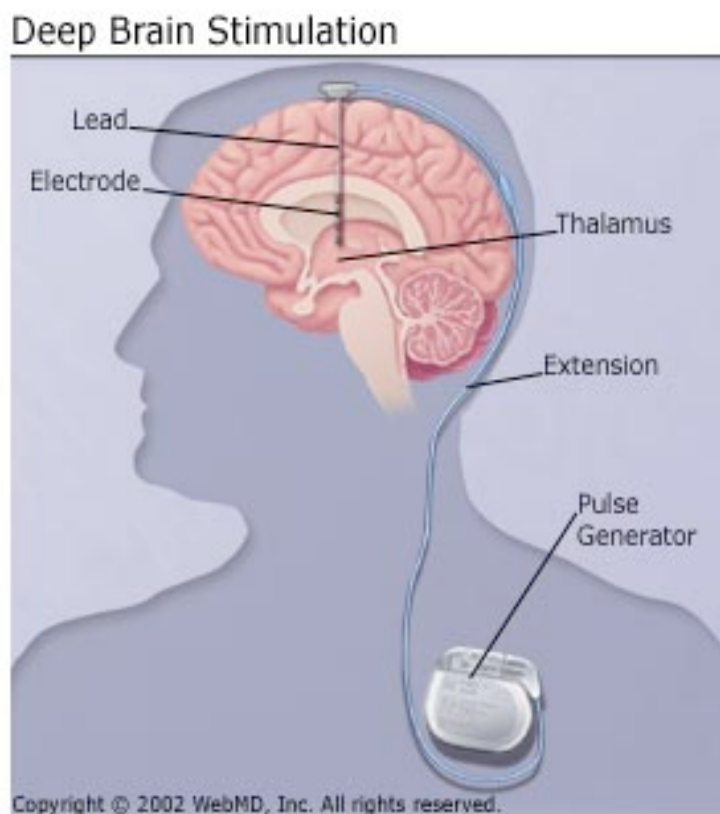


Figure 14 : Stimulation à haute fréquence : représentation schématique de l'emplacement des électrodes dans le cerveau et du boîtier de stimulation.

C'est en 1987 que l'équipe de Bénabid a introduit la technique de stimulation à haute fréquence du noyau ventral intermédiaire du thalamus qui a été améliorée en 1990 par la stimulation des noyaux sous-thalamiques (Bergman, Wichmann, and DeLong 1990) chez le singe pour l'introduire finalement chez l'homme (1993).

Il semblerait que l'effet principal de la SHF soit une inhibition des structures ciblées. En effet, de nombreux travaux d'électrophysiologies ont convergé vers cette hypothèse et l'idée que cette inhibition pourrait être liée au ciblage particulier des axones par les SHF, pouvant provoquer à fois des potentiels d'action ortho- et antidromiques, les premiers ayant un effet en inhibant les corps cellulaires de la structure ciblée alors que les second ont plutôt un effet sur les structures efférentes de la structure simulée en imposant une nouvelle activité au système (Carron et al. 2011). La stimulation à haute fréquence permet des résultats impressionnants sur les tremblements, tout en limitant les dyskinésies. Mais ce traitement reste encore limité à une petite portion de la population.

4.3 Autres types de traitements :

Ces traitements ont pour but de changer le style de vie des patients. Ces traitements peuvent inclure des changements diététiques, des séances d'exercice physique pour maintenir une bonne mobilité des patients, des séances de rééducation orthophonique pour limiter et soigner certains troubles de la parole. Ces traitements sont complémentaires aux autres traitements présentés précédemment.

Partie III : La drosophile comme modèle d'étude du système nerveux et de ses maladies

1 Le système nerveux central de la drosophile

La drosophile possède un système nerveux central relativement complexe. On dénombre environ 200 000 neurones dans le cerveau de la drosophile, ce qui permet à cet organisme d'exprimer une grande variété de comportements. On peut subdiviser le SNC de la drosophile en deux parties : le cerveau qui est responsable principalement de l'intégration des perceptions sensorielles et du contrôle des réponses comportementales, et la corde ventrale qui comprend les corps cellulaires des neurones moteurs contrôlant directement la locomotion (marche et vol) et des interneurones régulant l'activité de ces neurones moteurs.



Figure 14 : Représentation du SNC de la drosophile.

Les parties grisées représentent le corps de la drosophile, on distingue ainsi la tête et ses différentes parties comme le proboscis et les yeux. Les parties violettes représentent le SNC de la drosophile ; on distingue le cerveau dans la tête et la corde ventrale dans le thorax de la drosophile (Hartenstein, 1993 atlas).

1.1 Le cerveau et ses composants

Le cerveau de la drosophile se subdivise en plusieurs régions distinctes en partie caractérisées. Certaines structures sont aisément visibles : les lobes optiques, premiers relais d'intégration des signaux provenant des yeux (vision), les lobes antennaires qui sont responsables de l'intégration des signaux venant des antennes (perception des odeurs), et des régions différenciées du neuropile comme les corps pédonculés (*mushroom bodies*), le centre de la mémoire olfactive associative chez les insectes, ou le complexe central, qui contrôle diverses fonctions supérieures comme l'attention visuelle et la mémoire spatiale.

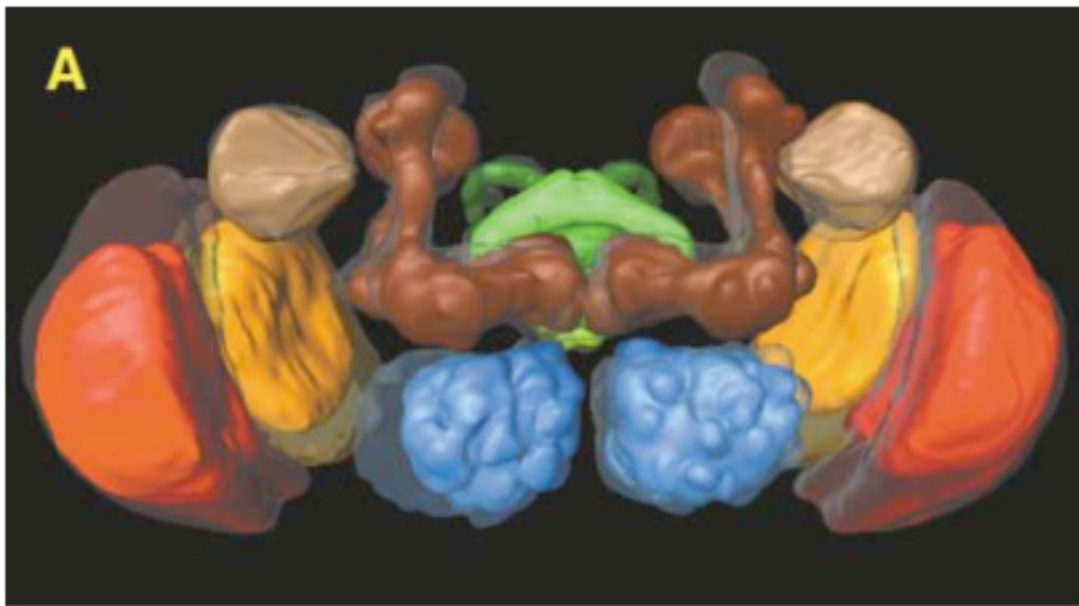


Figure 15 : Représentation en 3D des principales structures du cerveau adulte de drosophile.

En rouge, la medulla, en orange, la lobula, en jaune la plaque de la lobula, en marron, les corps pédonculés, en beige, les cornes latérales, en bleu les lobes antennaires, en vert le complexe central composé du corps ellipsoïde, des nodules, du corps en éventail et du pont protocérébral (Rein et al. 2002).

Les corps pédonculés ont été intensément étudiés du fait de leur implication dans la mémoire olfactive (Connolly et al. 1996; de Belle and Heisenberg 1994; Dubnau et al. 2001; McBride et al. 1999; McGuire, Le, and Davis 2001; Zars et al. 2000; Isabel, Pascual, and Preat 2004; Gervasi, Tchénio, and Preat 2010). Le complexe central qui regroupe le corps ellipsoïde, les nodules par paire, le corps en éventail et le pont protocérébral ont quand à eux des fonctions variées telles que le contrôle moteur, le conditionnement olfactif, certains aspects du comportement de cour, la tolérance à l'alcool et la mémoire spatiale (Bausenwein, Müller, and Heisenberg 1994; Heisenberg et al. 1985; Joiner and Griffith 2000; Scholz et al. 2000; Strauss and Heisenberg 1993; Neuser et al. 2008).

1.2 Le ganglion suboesophagien

Le ganglion suboesophagien (GSO) est une zone du cerveau qui se compose d'environ 6000 neurones et sert principalement de relai entre le cerveau et la corde ventrale. Il reçoit les projections des neurones gustatifs du proboscis, des alentours de la bouche et les pattes (Stocker 1994). Les neurones gustatifs qui projettent dans le GSO viennent de régions variées, ce qui suggère un rôle important du GSO dans le goût (Thorne et al. 2004; Z. Wang et al. 2004). Il est également connu que le GSO se compose de motoneurones qui permettent l'extension du proboscis et l'alimentation (Stocker 1994).

1.3 La corde ventrale

La corde ventrale (CV) est une structure nerveuse localisée au niveau du thorax et qui contribue fortement au mouvement car elle contient en particulier les motoneurones contrôlant la locomotion. Outre ses fonctions motrices, la CV participe également aux comportements de cour. Elle reçoit également les afférences des neurones sensoriels du

système nerveux périphérique provenant des pattes, des ailes et d'autres parties du corps de la mouche.

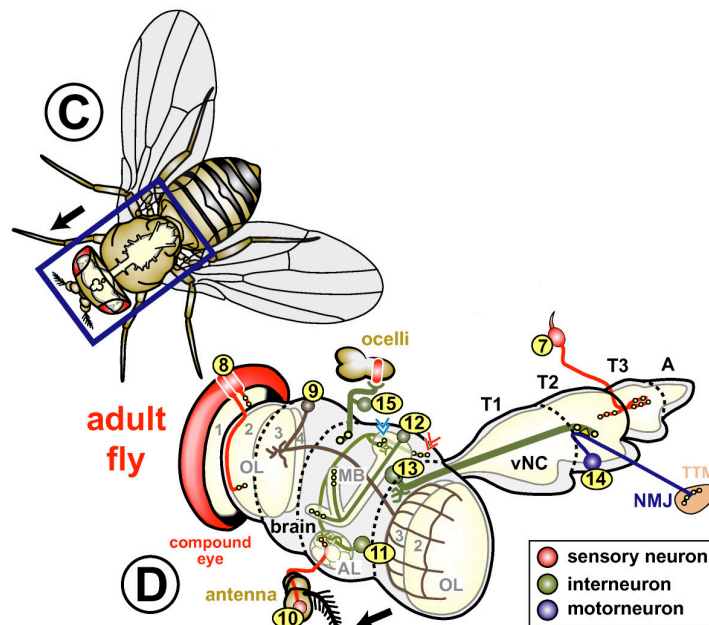


Figure 16 : Organisation du SNC chez l'adulte.

C) et D) Le SNC se répartit dans la tête pour le cerveau et le thorax pour la corde nerveuse ventrale. D) Le cerveau comprend une organisation très riche et possède des lobes optiques (ol), des lobes antennaires (AL) et des corps pédonculés (MB). La corde nerveuse ventrale se divise en plusieurs parties (T1, T2, T3 et A). Le SNC reçoit les afférences de neurones sensoriels venant de la périphérie.

1.4 Les différents types de cellules nerveuses chez la drosophile

Chez la drosophile, le SNC est recouvert sur toute sa surface d'une couche isolante de cellules gliales qui rappelle la barrière hémato-encéphalique des mammifères. Au sein du SNC, on distingue le cortex (voir figure) localisé en périphérie, du neuropile situé plus en profondeur. Le cortex contient de nombreux corps cellulaires neuronaux et gliaux. Les projections neuronales (dendrites et axones) s'arborescent dans le neuropile où sont localisés

la majorité des contacts synaptiques. La glie du cortex enveloppe les corps cellulaires et peut également envoyer des prolongements dans le neuropile. Le neuropile contient d'autres types de cellules gliales comme la glie engainante qui phagocytose les débris cellulaires et la glie réticulaire (*astrocyte-like*) (Figure 17).

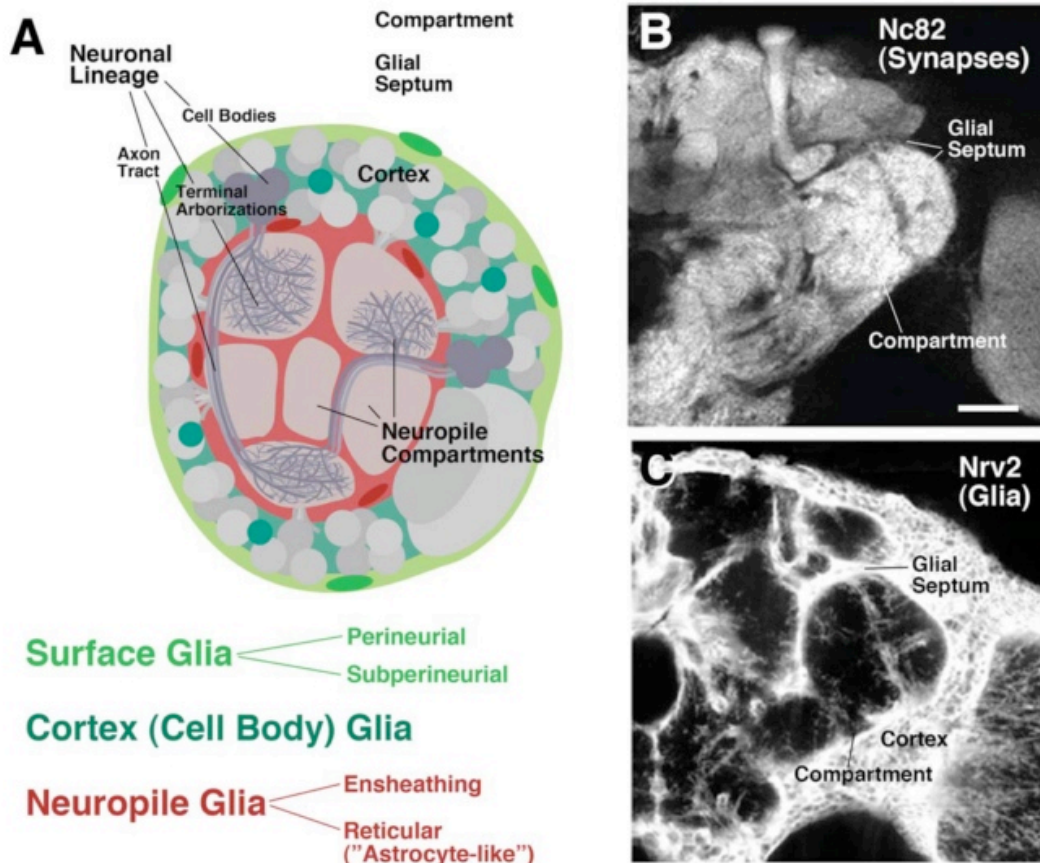


Figure 17 : Compartmentation des neurones et des cellules gliales dans le SNC de la drosophile (Hartenstein 2011).

1.4.1 Les neurones :

Le SNC de la drosophile comprend une très grande variété de neurones, différant par exemple par le type de neurotransmetteur qu'ils expriment : neurones dopaminergiques, sérotoninergiques, glutamatergiques, cholinergiques, histaminergiques, GABAergiques, ou exprimant des neuropeptides spécifiques. Comme ceux des mammifères, les neurones de drosophiles possèdent une polarité avec des compartiments distincts, dendritique et axonal.

Pendant longtemps, on a cru que les neurones des drosophiles étaient majoritairement unipolaires, comme chez d'autres invertébrés. En fait, les neurones de drosophiles peuvent être unipolaires ou multipolaires (Sánchez-Soriano et al. 2005; Yamamoto et al. 2006). Certains neurones sont uniquement unipolaires comme les motoneurones, les cellules de Kenyon (neurones des corps pédonculés) et de nombreux neurones sensoriels.

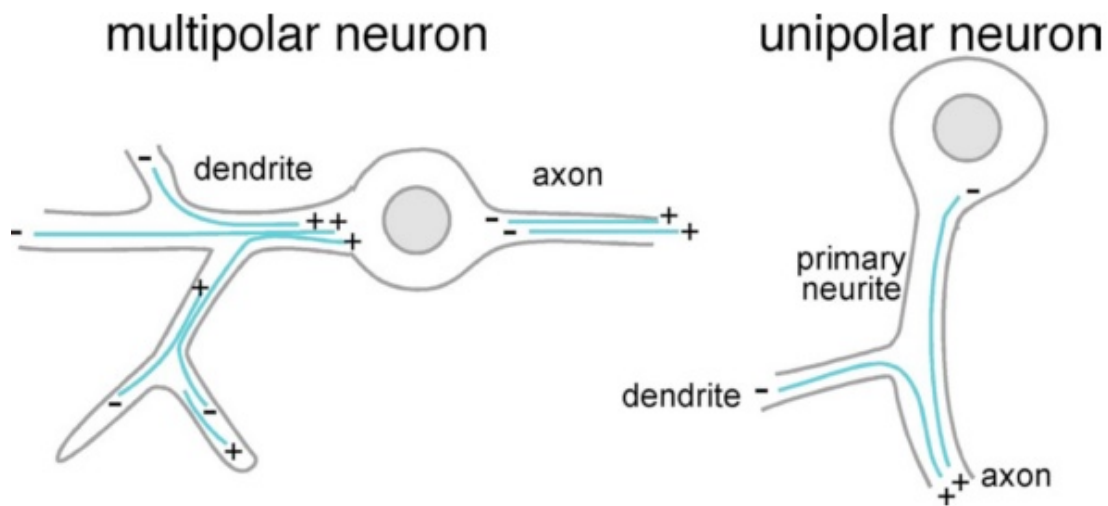


Figure 18 : Polarité des neurones de drosophile (Rolls, 2011) (d'après Stone et al. 2010).

1.4.2 Les cellules gliales :

Une des fonctions essentielles des cellules gliales est d'isoler les composants du système nerveux en les entourant d'une ou plusieurs couches engainantes. Ces cellules participent au maintien des fonctions neuronales sur le plan métabolique et possèdent également un rôle physiologique. Comme indiqué ci-dessus, il existe plusieurs catégories de cellules gliales chez la drosophile : la glie de surface, la glie du cortex, la glie du neuropile et la glie du système nerveux périphérique. La glie de surface comprend deux types cellulaires: les cellules périneuriales et les cellules subpérineuriales. La glie du neuropile se subdivise également en deux catégories : la glie engainante et la glie de type astrocytaire. La glie du cortex est une glie associées aux corps cellulaires qui est très similaire aux astrocytes. Elle se trouve au niveau du cortex et envahie tout l'espace se trouvant entre les corps cellulaires

de neurones et effectue le contact avec l'équivalent de la barrière hématoencéphalique chez les mammifères et permet d'acheminer les éléments nutritifs ainsi que l'oxygène (Pereanu, Shy, and Hartenstein 2005; Ito, Urban, and Technau 1995). Elle serait également impliquée dans la synapse tripartite (Rival et al. 2004). Le principal rôle de la glie de surface est d'entourer et de protéger l'ensemble du cerveau, un peu à la manière de la barrière hématoencéphalique chez les mammifères. La glie engainante aurait davantage un rôle comparable à celui des oligodendrocytes des mammifères, avec un enroulement autour des axones, et un rôle important dans le remodelage axonal (phagocytose) en cas par exemple de blessure. La glie de type astrocytaire aurait, quand à elle, un rôle comme son nom l'indique plutôt d'astrocyte dans le neuropile et l'acheminement des nutriments aux neurones. Enfin, la glie du système nerveux périphérique (SNP) est une glie qui s'enroule autour des axones du SNP (Hartenstein 2011; Auld et al. 1995; Leiserson, Harkins, and Keshishian 2000; Freeman and Doherty 2006; Rival et al. 2006).

2 La dopamine

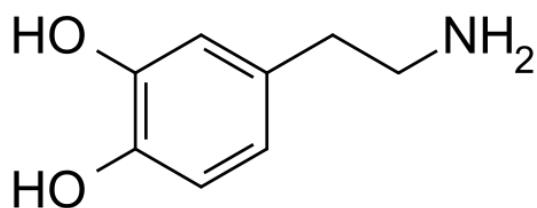


Figure 19 : Formule chimique de la dopamine.

La dopamine (DA) est une amine biogène synthétisée à partir de la L-tyrosine. C'est est un neurotransmetteur de la famille des catécholamines, qui est aussi un précurseur dans la voie de biosynthèse de deux autres catécholamines essentielles, l'adrénaline (épinéphrine) et la

noradrénaline (norépinéphrine) chez les mammifères. La dopamine est conservée dans tout le règne animal et largement distribuée dans le cerveau des drosophiles (Figure 20) (Monastiriotti 1999; Nässel and Elekes 1992; Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003; Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011) où elle est la seule catécholamine.

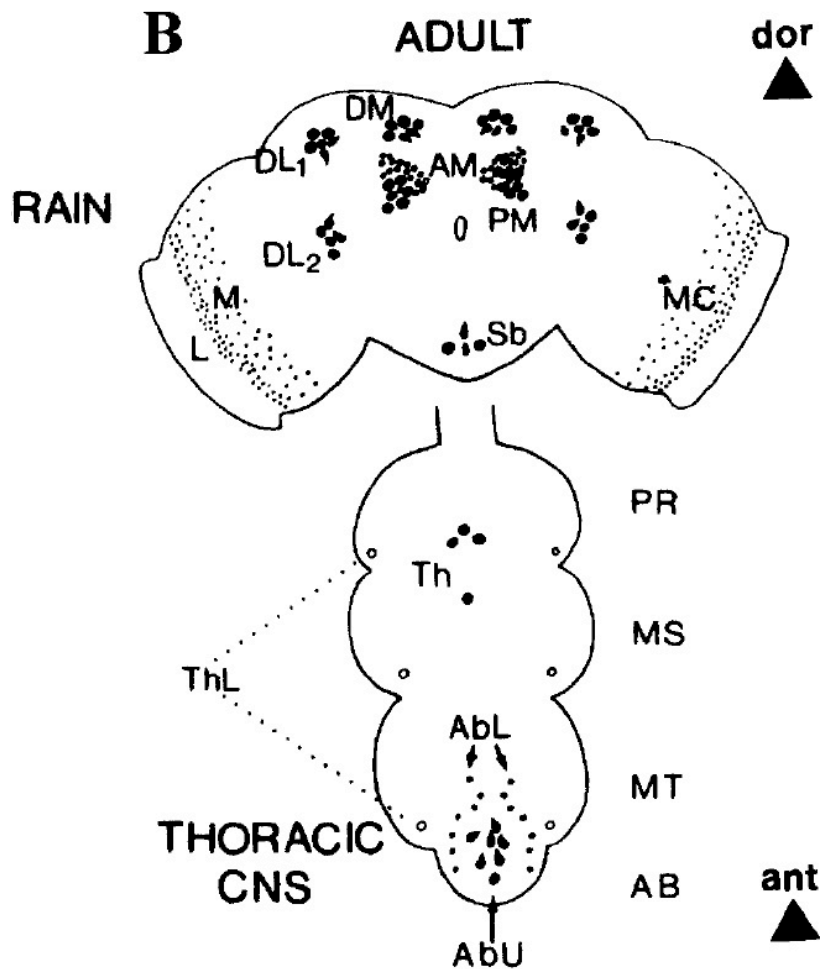


Figure 20 : Schéma des différents groupes (*clusters*) de neurones dopaminergiques chez la drosophile adulte (Monastiriotti, 1999).

La dopamine est un neurotransmetteur impliqué dans de nombreux processus biologiques et comportementaux, La dopamine ne fait pas partie des neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs rapides comme l'acétylcholine, le glutamate ou le GABA, qui sont fréquemment associés à des récepteurs de type ionotropiques. La dopamine joue plutôt un rôle de

neuromodulateur à plus long terme des activités synaptiques en se liant à des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont de deux types : récepteurs de la famille D1 couplés à une protéine G activatrice de l'adénylate cyclase et récepteurs de la famille D2, couplés à une protéine G inhibitrice de l'adénylate cyclase (Drago et al. 1998; Missale et al. 1998). Cette classification élaborée chez les mammifères semble avoir été en partie conservée chez la drosophile (voir ci-dessous).

Chez les mammifères, la dopamine a été associée au contrôle des mouvements, des processus cognitifs (apprentissage et mémoire), des émotions, du sentiment de plaisir (*reward*) et de l'addiction. De nombreux troubles neurologiques ou comportementaux chez l'homme ont pour origine des dysfonctionnements du système dopaminergique. C'est le cas en particulier de la maladie de Parkinson ou de l'addiction aux drogues. Un rôle comparable de la dopamine dans de nombreux processus fondamentaux se retrouve aussi chez d'autres organismes plus simples, comme la drosophile.

2.1 Rôles de la dopamine chez la drosophile

Chez les drosophiles, la DA est très étudiée actuellement du fait de son rôle dans l'apprentissage olfactif (Tempel, Livingstone, and Quinn 1984; Claridge-Chang et al. 2009; Y.-C. Kim, Lee, and Han 2007; Krashes et al. 2009; Riemensperger et al. 2005; Schwaerzel et al. 2003; Seugnet et al. 2008; Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011). Un des arguments en faveur de ce rôle réside dans l'abondance de la signalisation dopaminergique au niveau des corps pédonculés (Nässel and Elekes 1992; Han et al. 1996; Riemensperger et al. 2005; Claridge-Chang et al. 2009; Aso et al. 2010; Plaçais et al. 2012; Berry et al. 2012) La DA joue également un rôle chez la drosophile dans le contrôle de l'activité locomotrice (Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003; Lima and Miesenböck 2005; Yellman et al. 1997; Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011), de l'éveil et du sommeil (Rozi Andretic, van Swinderen, and Greenspan

2005; Ganguly-Fitzgerald, Donlea, and Shaw 2006; Kume et al. 2005; Lebestky et al. 2009; Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011; Ueno et al. 2012) de la prise alimentaire et de l'attraction au sucre (Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011; Marella, Mann, and Scott 2012) et de la sensibilité ou l'attrance à la lumière (Jay Hirsh et al. 2010; Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011).

2.2 Le système dopaminergique chez la drosophile

Chez la drosophile comme chez les mammifères, la biosynthèse et l'acheminement de la dopamine nécessitent plusieurs partenaires enzymatiques et protéiques. Deux enzymes cytosoliques sont nécessaires pour synthétiser la dopamine : la tyrosine hydroxylase (TH) qui catalyse la transformation de la L-tyrosine en L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) (Neckameyer and Quinn 1989; Birman et al. 1994) et la DOPA décarboxylase (Ddc) (J Hirsh and Davidson 1981) qui transforme la L-DOPA en dopamine (Figure 21).

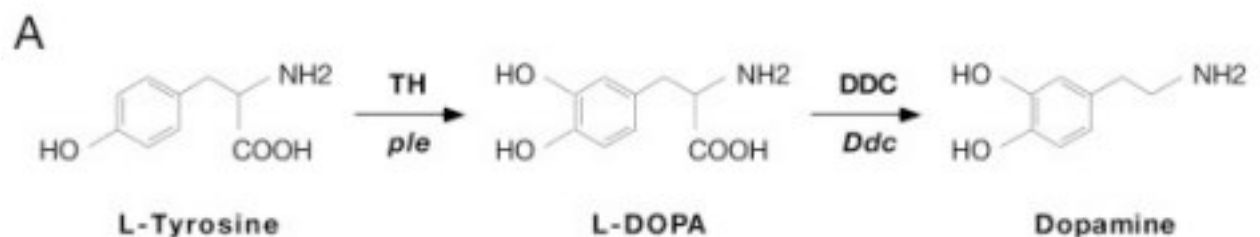


Figure 21 : Voie de biosynthèse de la dopamine chez la drosophile.

La dopamine est synthétisée à partir de la L-Tyrosine. La première étape est catalysée par la tyrosine hydroxylase (TH, codée par le gène pale) et est limitante pour la synthèse de la dopamine. La seconde étape permet de synthétiser la dopamine à partir de la L-DOPA et est catalysée par la dopadécarboxylase (DDC).

La dopamine est ensuite importée et concentrée dans des vésicules synaptiques, via le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT). VMAT est important pour l'homéostasie de la dopamine dans le système nerveux en régulant la quantité de dopamine pouvant être libérée (Simon et al. 2009; Lawal et al. 2010).

La TH catalyse la première étape de la biosynthèse de dopamine chez la drosophile. Il existe un épissage alternatif du gène *pale* de la TH en fonction des tissus qui permet de générer deux transcrits: DTH I et DTH II (Birman et al. 1994). DTH I est exprimé dans le SNC alors que DTH II est exprimé dans des tissus non nerveux comme l'épiderme (Birman et al. 1994). La forme DTH II est requise pour la pigmentation et l'assemblage de la cuticule (Wright 1987; Hopkins and Kramer 1992). La différence réside dans le fait que DTH II contient un segment acide de 71 amino acides dans le domaine de régulation. L'épissage alternatif du gène de la TH est un processus vital pour le bon développement des drosophiles (Vié et al. 1999; Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003). La TH est requise pour la formation de la cuticule, l'exosquelette qui protège les drosophiles. Des mutants pour ce gène sont létaux et ce phénotype peut être sauvé par la réintroduction du gène spécifiquement dans la cuticule (Neckameyer and White 1993).

La signalisation dopaminergique est largement distribuée dans de nombreuses aires du SNC chez les drosophiles. Chaque cluster dopaminergique innerve une partie particulière du cerveau (Mao and Davis 2009; Selcho et al. 2009; White, Humphrey, and Hirth 2010) et de la corde ventrale (Draper et al. 2007).

2.3 Les récepteurs dopaminergiques chez la drosophile

Les récepteurs dopaminergiques sont des protéines comprenant 7 segments transmembranaires qui sont couplés à des protéines G activatrices (récepteurs de type D1) ou inhibitrices (type D2) de l'adénylate cyclase, l'enzyme de synthèse de l'AMPc. On trouve

5 récepteurs de la dopamine chez les mammifères (type D1: D1 et D5 ; type D2: D2, D3 et D4) alors que 4 ont été identifiés jusqu'à présent chez la drosophile (type D1: dDA1) Gotzes et al., 1994; Sugamori et al., 1995;) et DAMB (Han et al., 1996, Feng et al., 1996); type D2: DD2R (Hearn et al. 2002) et un inclassable: DopEcR (Srivastava et al., 2005).

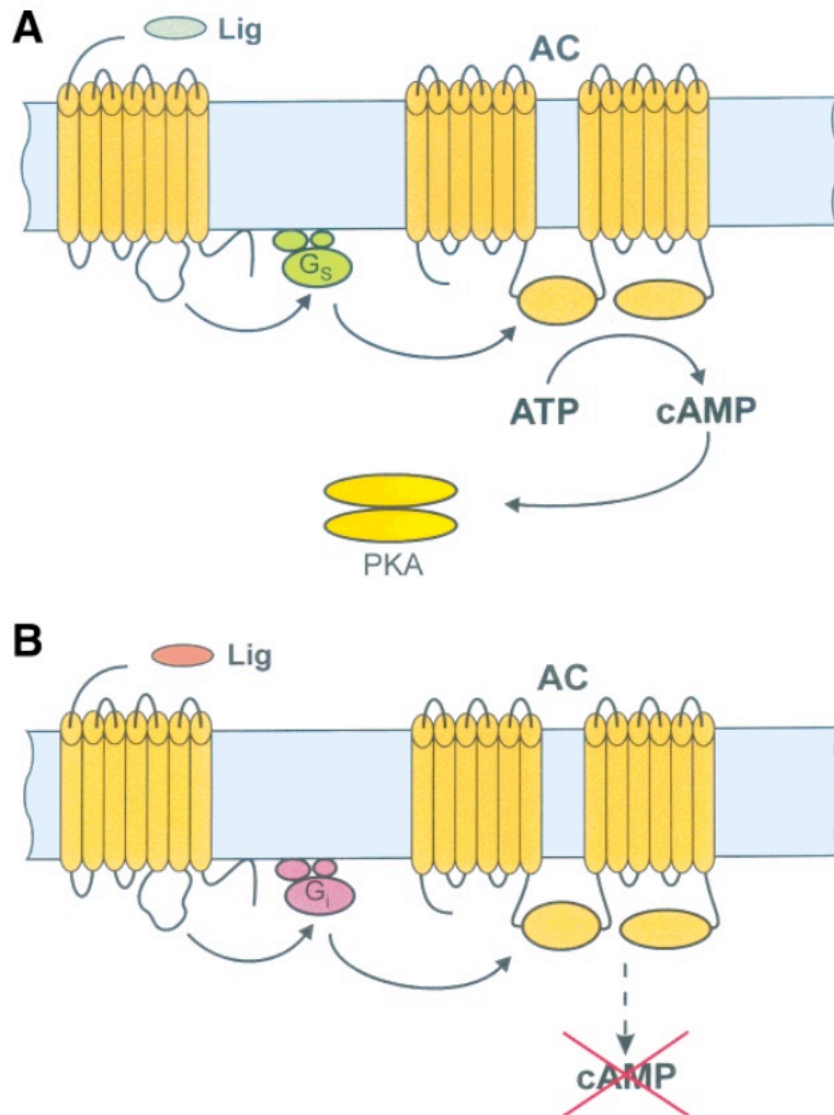


Figure 22 : RCPGs et voies associées (Blenau & Baumann, 2001).

Les récepteurs de type D1 de la Drosophile sont des récepteurs couplés à des protéines Gs activatrice. Le récepteur dDA1/Dumb, découvert par Sugamori et coll., en 1995 est présent, chez l'adulte, dans les corps pédonculés et le complexe central, plus particulièrement au niveau des nodules, du corps en éventail et du corps ellipsoïde mais absent du pont

protocérébral. Le récepteur dDA1 est également exprimé dans le ganglion ventral (Y.-C. Kim et al. 2003). Le récepteur DAMB est un récepteur plus particulier, découvert par K. Han et coll. en 1996 et Evans et coll (Feng, Hannan, Evans, Hall, Hon, et al. 1996), qui a une expression majoritaire dans les corps pédonculés. Couplé aux protéines Ga, DAMB est également capable d'activer la phospholipase C, ce qui a pour conséquence une libération du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique (Feng, Hannan, Evans, Hall, and Hon 1996).

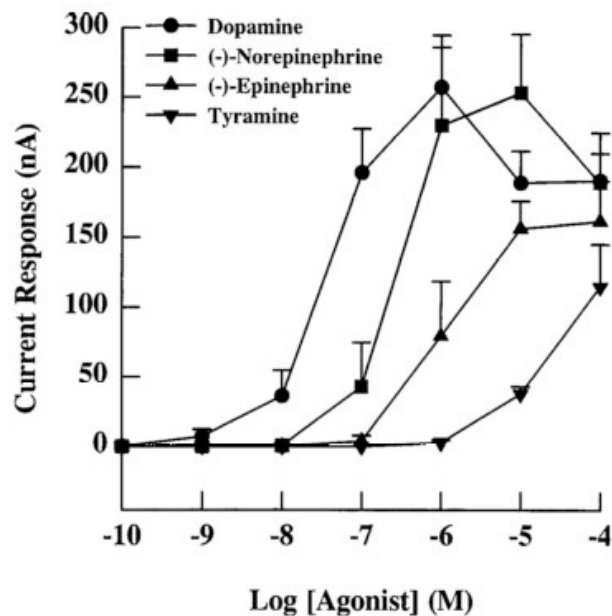


Figure 23 : Activation de DAMB dans les ovocytes de xénope par différents neurotransmetteurs.

L'activation de la phospholipase c par le récepteur DAMB, qui augmente l'hydrolyse du phosphatidyl inositol, entraîne la libération de Ca^{2+} intracellulaire. Cette libération de Ca^{2+} peut être suivie dans les ovocytes de xénope par l'activation d'un courant chlore dépendant du calcium (Feng, Hannan, Evans, Hall, and Hon 1996).

Le récepteur D2R a été décrit par Hearn et coll., en 2002 comme un homologue des récepteurs dopaminergiques de type D2 des mammifères. Il est également couplé aux

protéines Gi/o, c'est à dire que lorsqu'il est activé, il y a une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, et donc une réduction de l'AMPc. La DA est un très bon agoniste du récepteur. De plus, l'activation de ce récepteur semble avoir des effets physiologiques puisque l'activation de ce récepteur par un agoniste tel que la quinpirole augmente les comportements de toilettage et de locomotion sur des drosophiles décapitées (Yellman et al. 1997; R Andretic and Hirsh 2000). Le récepteur D2R semble majoritairement présent au niveau du ganglion ventral et des lobes optiques (Draper et al. 2007).

3 Le glutamate

Le glutamate (Glu) est un neurotransmetteur exciteur, chez les vertébrés comme chez les drosophiles.

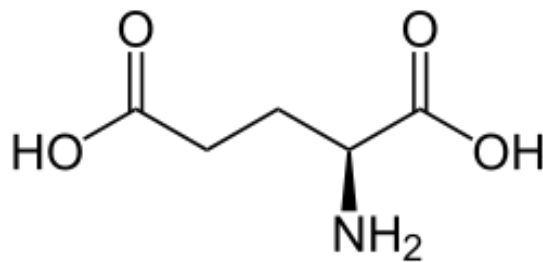


Figure 24 : Représentation de la formule du glutamate.

3.1 Rôles du glutamate chez la Drosophile

Le Glu possède plusieurs rôles majeurs chez la drosophile. Le plus connu d'entre eux est certainement son implication dans la synapse entre les motoneurones et les muscles. En effet, contrairement aux mammifères, la jonction neuro-musculaire n'est pas assurée par le neurotransmetteur AcétylCholine mais par le Glu (Jan and Jan 1976). Depuis, les mécanismes de neurotransmission sont largement étudiés dans cette jonction neuro-musculaire et plus particulièrement chez la larve. Pendant de longues années, le rôle du glutamate chez la drosophile n'a pas davantage été connu. Cependant, on connaît depuis

peu son implication dans de nombreuses fonctions comme le cycle circadien notamment du fait de la présence de neurones glutamatergiques dans certains de ces neurones, dans la vision du fait de la représentation très importante des neurones Glu dans la medulla (Raghu and Borst 2011). Ces neurones jouent un rôle central dans le mouvement puisque le Glu est le neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire. Le Glu est aussi très présent dans les structures impliquées dans la mémoire (innervation des corps pédonculés). La transmission glutamatergique est également fortement représentée dans les lobes antennaires. On peut donc dire que la transmission glutamatergique est une signalisation majeure du système nerveux des drosophiles, tout comme chez les mammifères où le glutamate représente la majorité des transmissions synaptiques. Il y a encore très peu de données sur le glutamate chez la drosophile adulte, on sait cependant par des études anatomiques qu'il innerve la majorité des aires nerveuses chez la drosophile (Kahsai et al. 2012; Das et al. 2011).

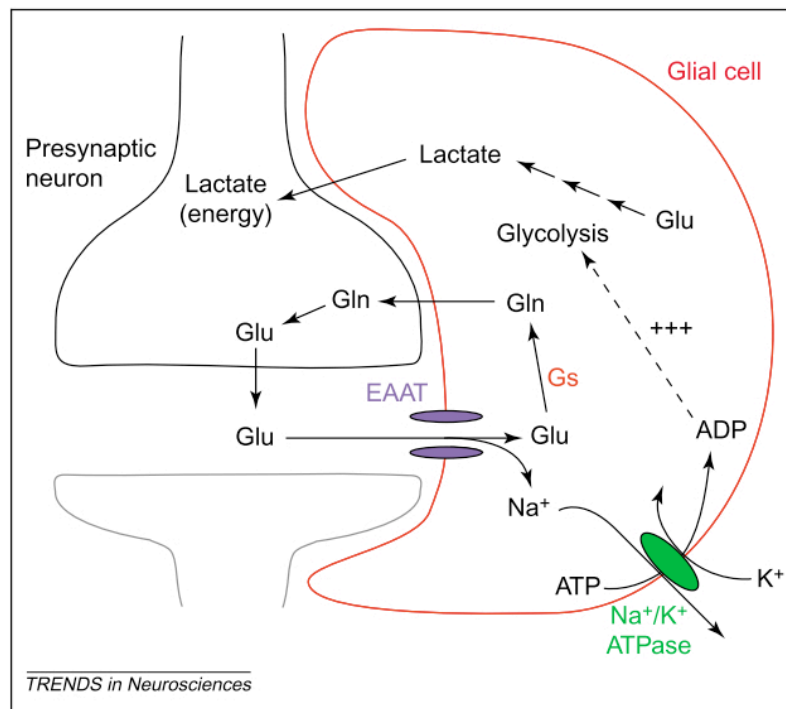


Figure 25 : La synapse tripartite.

Cette synapse se compose de trois parties comme on peut le voir sur ce schéma : le neurone présynaptique qui libère du glutamate (Glu), le neurone cible en post-synaptique et les cellules gliales de type astrocytes. Les cellules gliales permettent le recyclage du glutamate qui se trouve dans la fente synaptique en glutamine (Gln) par l'intervention de la

glutamine synthétase (Gs) qui est ensuite libéré et récupéré par le neurone pré-synaptique glutamatergique pour synthétiser à nouveau du glutamate (Freeman and Doherty, 2006).

La synapse tripartite est une particularité liée à la toxicité du glutamate. Elle fait, comme son nom l'indique, intervenir 3 participants au niveau de la synapse : le neurone présynaptique, le neurone postsynaptique et une cellule gliale. La présence de la cellule gliale est nécessaire, elle permet en effet de tamponner le milieu extracellulaire en glutamate et participe à une boucle de recyclage du glutamate vers le neurone présynaptique. Des travaux ont montrés que l'inhibition du transporteur glutamatergique gliale de la drosophile induit des mécanismes d'excitotoxicité (Rival et al. 2004).

3.2 Les neurones glutamatergiques chez la Drosophile :

3.2.1 Les interneurones

De nombreux interneurones (IN) glutamatergiques interviennent dans le fonctionnement normal du cerveau de la mouche. Tout comme chez les mammifères, leur rôle est de faire le lien entre des structures nerveuses afférentes et efférentes. Il n'est donc pas rare que chez la drosophile les IN fassent le lien entre des neurones qui peuvent être senseurs par exemple et d'autres neurones qui peuvent être par exemple des motoneurones (voir partie suivante). Il existe de nombreux modèles d'étude des interneurones Glu. Par exemple, les IN glutamatergiques des lobes antennaires permettent de faire le lien entre les neurones sensoriels présents dans les antennes et les différentes zones du cerveau (Das et al. 2011). Au niveau de la corde nerveuse ventrale, on trouve également des interneurones qui assurent le lien entre les fibres géantes descendantes du cerveau jusqu'à la CNV, et permettent de gérer l'initiation des mouvements ainsi que les neurones moteurs de la CNV (Rickert et al. 2011).

3.2.2 Les motoneurones

Les motoneurones sont des neurones qui innervent les structures musculaires. Les motoneurones sont de plusieurs classes et existent à partir de stade larvaire du développement de la drosophile.

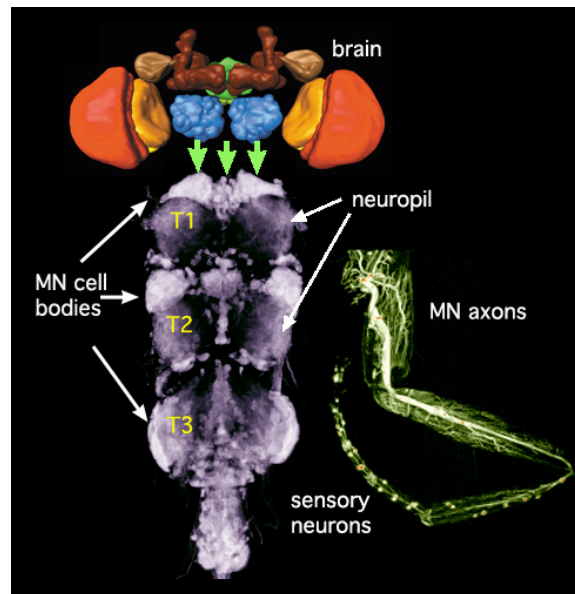


Figure 26 : Schéma représentatif des motoneurones chez la drosophile adulte (Beak and Mann, 2009).

Les motoneurones sont situés majoritairement dans la corde nerveuse ventral dans chaque zone T1, T2, T3 et A et envoient leurs projections dans les muscles en périphérie (représentées ici dans la patte).

4 Modélisation des maladies neurodégénératives :

Depuis les travaux initiaux des laboratoires de Seymour Benzer (Kretschmar et al., 1997 ; Min and Benzer, 1997 ; Min and Benzer, 1999), Nancy Bonini (Warrick et al., 1998) et Lawrence Zipursky (Jackson et al., 1998) il y a une quinzaine d'années, la drosophile est devenue un organisme modèle largement utilisé pour la modélisation des maladies

neurodégénératives humaines comme la MP (Feany and Bender 2000; Auluck et al. 2002), les maladies à expansion de polyglutamines (Warrick et al. 1998; G R Jackson et al. 1998) ainsi que la maladie d'Alzheimer et les tauopathies (Wittmann et al. 2001; Tschäpe et al. 2002). De nombreux avantages justifient l'utilisation de la drosophile pour modéliser ces maladies. En premier lieu, on peut citer le fait que la durée de vie de cet organisme est courte (au maximum 70 jours à 25°C) et que le temps de génération est très rapide (10-12 jours suivant le génotype à 25°C). En deuxième lieu, malgré une distance évolutive d'au moins 700 millions d'années entre la drosophile et l'homme (Douzery et al. 2004), la mouche du vinaigre reste un excellent outil génétique pour l'étude des maladies humaines. En effet, d'une part, environ 70% des gènes impliqués dans des maladies chez l'homme ont un gène homologue dans le génome de la drosophile. D'autre part, de nombreux outils génétiques existent qui permettent la surexpression, l'expression ectopique ou encore l'inhibition de certains gènes d'intérêt, comme le système UAS-Gal4 utilisant un facteur de transcription de la levure (Brand and Perrimon 1993). La figure 27 récapitule le principe de ce système. On comprend donc que la descendance issue de ce croisement exprimera la protéine Gal4 capable de se fixer sur les séquences régulatrices UAS également présentes dans le génome et ainsi permettre l'expression du gène d'intérêt (nommé ici *Human gene*).

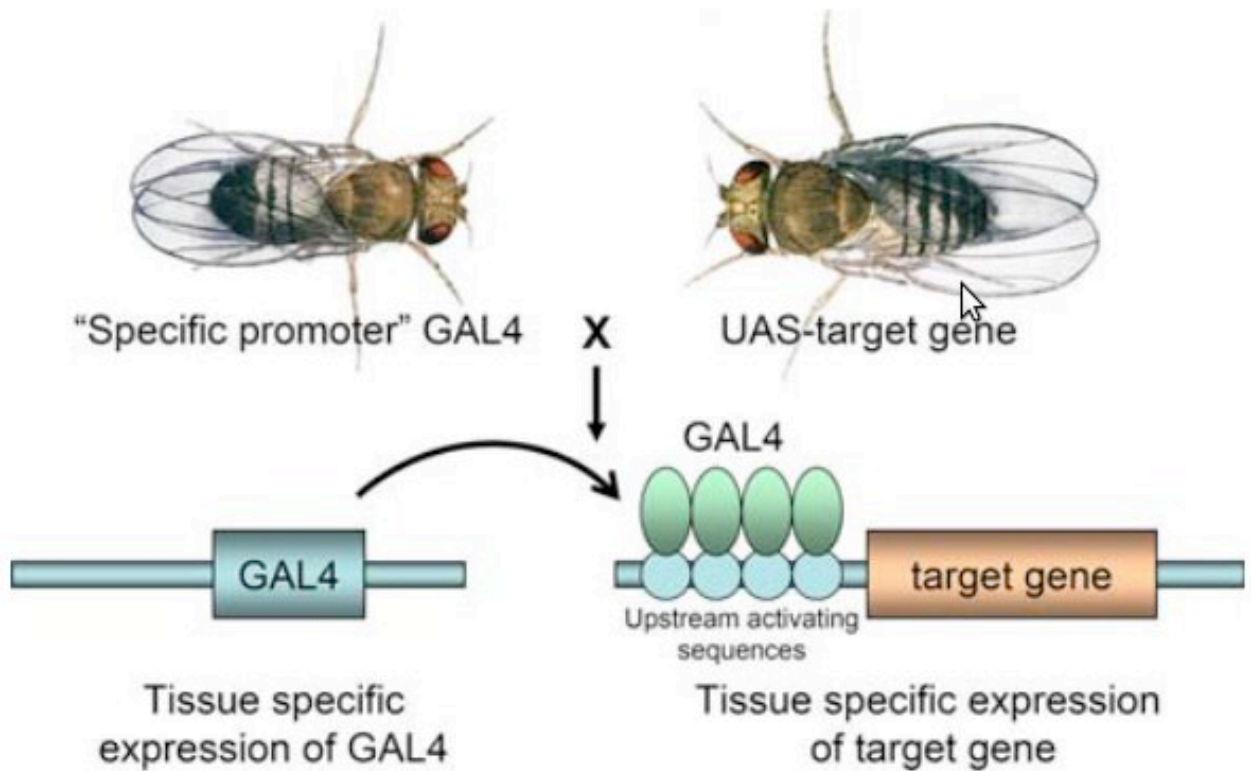


Figure 27 : Le système UAS-GAL4 chez la drosophile. (Muqit et Feany, 2002)

4.1 Maladies par expansion de polyglutamine et maladie d'Alzheimer

4.1.1 Les maladies par expansion de polyglutamines (polyQ)

Ces maladies neurodégénératives d'origine génétique sont caractérisées par la présence de protéines mutées pathogènes contenant une expansion d'homopolymère de glutamine provenant de l'expansion anormale du codon CAG dans les gènes correspondants. Parmi les neuf maladies à polyQ actuellement connues, on trouve la maladie de Huntington (MH) et six types d'ataxies spinocérébelleuses (SCA). Ces maladies sont causées par la mutation d'un seul gène, par exemple la Huntingtine pour la MH et différentes ataxines ou d'autres protéines suivant le type de SCA. Ces pathologies se caractérisent par une accumulation d'agrégats de peptides polyglutaminés provenant de la protéine mutante dans des inclusions nucléaires ou plus rarement cytoplasmiques, des symptômes moteurs, évoluant parfois en

symptômes cognitifs et neuropsychiatriques, et une neurodégénérescence progressive localisée dans des régions cérébrales spécifiques pour chacune de ces maladies.

C'est en 1998 que la drosophile a été utilisée pour la première fois comme modèle de ces maladies par l'utilisation de transgènes produits à partir des protéines mutées humaines (G R Jackson et al. 1998; Warrick et al. 1998). Ces premiers modèles confirmèrent que plus il y a de répétitions de CAG, plus la dégénérescence est sévère et que les effets délétères dépendent du type cellulaire, les neurones étant particulièrement sensibles. D'autres études ont montré que la présence seule des polyQ est toxique pour les cellules et que l'accumulation des peptides polyQ dans les cellules gliales peut également induire des effets toxiques et une létalité (Kretzschmar et al. 2005; Liévens et al. 2005; Liévens et al. 2008; Liévens and Birman 2007; Tamura et al. 2009) en utilisant les molécules impliquées respectivement dans la MH et dans SCA3. Ces résultats obtenus chez la drosophile ont suggéré que les cellules gliales pourraient jouer un rôle important dans les pathologies humaines correspondantes. Les modèles drosophile ont également permis de montrer que, dans le cas d'une autre maladie à polyQ, l'atrophie musculaire spino-bulbaire, confiner la protéine mutée à l'extérieur du noyau permettait de limiter les neurodégénérescences (Takeyama et al. 2002; Warrick et al. 1998). Par la suite, l'exploitation de ces modèles *in vivo* a mis en évidence que la régulation de la transcription avait une part importante dans la toxicité des polyQ (Bilen and Bonini 2007; Branco et al. 2008; Fernandez-Funez et al. 2000; Steffan et al. 2001; Taylor et al. 2003). Cependant, le rôle des inclusions nucléaires dans les neurodégénérescences reste encore mal compris. Certaines études semblent indiquer que ces inclusions correspondent à un mécanisme de défense limitant la toxicité des expansions de polyQ (Bilen and Bonini 2007; Klement et al. 1998; Saudou et al. 1998; Warrick et al. 1999).

4.1.2 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus commune chez les personnes âgées (5 à 10% des personnes de plus de 65 ans et près de 20% des plus de 80 ans dans les pays d'Europe de l'Ouest) et une cause prépondérante de démences (plus de

la moitié des cas de démences chez les personnes âgées). Elle se traduit par un déclin graduel des fonctions cognitives, commençant par la perte des souvenirs d'évènements récents, suivie de troubles de l'humeur, des émotions, du raisonnement et du langage, pour aboutir à une atteinte des fonctions autonomes et à la mort. La MA se caractérise par des lésions localisées principalement au niveau du néocortex et de l'hippocampe : les plaques séniles ou amyloïdes à l'extérieur et autour des neurones, et les enchevêtrements neurofibrillaires (NFT, *neurofibrillary tangles*) à l'intérieur des neurones. On observe des pertes importantes de neurones cholinergiques dans différentes structures, en particulier au niveau du noyau basal de Meynert. La MA peut se développer de façon précoce (formes clairement génétiques qui correspondent à moins de 5% des cas) ou tardive (forme sporadique dont l'étiologie reste mal comprise : associée à la présence d'allèles dans plusieurs gènes, à l'exposition à des polluants environnementaux comme l'aluminium ou le mercure, et certainement à d'autres causes non identifiées). De nombreuses équipes utilisent la drosophile pour modéliser les formes précoces de la maladie.

Les plaques amyloïdes se composent de fibrilles agrégées de peptides beta amyloïdes $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ (40 ou 42 suivant le nombre d'acides aminés du peptide), $A\beta_{42}$ étant la forme la plus toxique, produits à partir de la protéine membranaire APP (*amyloid precursor protein*) par action séquentielle de protéases, les β et γ -sécrétases. La β -sécrétase est une enzyme transmembranaire appelée BACE (*beta-site APP-cleaving enzyme*) et la γ -sécrétase est en fait un complexe de protéines incluant les présénilines (PS-1 et 2), la nicastrine, Aph-1 et Pen-2. Des mutations des protéines APP, PS-1 et PS-2 peuvent être à l'origine de l'accélération du déclenchement de la MA, induisant des formes précoces de la maladie (Selkoe 2001; Ye and Fortini 1999; Tanzi and Bertram 2005). Les NTF sont constituées de protéines Tau. Ce sont des protéines très solubles, que l'on trouve de façon particulièrement enrichie dans les axones car elles se lient aux microtubules. Dans le cas de la MA, Tau apparaît hyperphosphorylée et insoluble, formant ainsi les enchevêtrements pathogènes (Grundke-Iqbal et al. 1986; Goedert et al. 1993; Greenberg and Davies 1990).

Des homologues des gènes impliqués dans la MA existent chez la drosophile. Ainsi, des drosophiles déficientes pour le gène *β amyloid protein precursor-like* (*App1*, homologue de APP) montrent des comportements anormaux qui peuvent être compensés par l'expression de l'APP humain, indiquant l'existence d'une conservation fonctionnelle entre les deux protéines (Luo, Tully, and White 1992). D'autres études ont montré que la surexpression d'une forme humaine mutante d'APP peut induire des neurodégénérescences chez la drosophile (Finelli et al. 2004; Iijima et al. 2004; Stokin et al. 2008; Carmine-Simmen et al. 2009).

D'autres laboratoires ont utilisé comme modèle l'expression ectopique du peptide A β_{42} pour effectuer des cribles génétiques de modification des phénotypes neurodégénératifs. Ainsi, plusieurs voies intracellulaires de signalisation ont pu être impliquées telles que la voie Toll/NF κ B (L. Tan et al. 2008). Une autre étude a mis à jour le rôle de la néprilysine (enzyme capable de dégrader les peptides A β) qui lorsqu'elle est surexprimée permet une limitation des pertes neuronales et des dépôts de peptides amyloïdes. Il a été montré que la surexpression de la néprilysine s'accompagne d'une réduction de la transcription induite par le complexe CEBP (*cAMP-response element-binding protein*) et diminue les effets des peptides A β pathogènes chez la drosophile, tels que les dysfonctionnements axonaux ou la mort prématurée (Iijima-Ando et al. 2008).

La protéine tau (*tubule-associated unit*) étant directement impliquée dans la pathogenèse, de nombreux chercheurs se sont attachés à utiliser diverses formes de cette protéine pour modéliser la MA chez la drosophile (Williams, Tyrer, and Shepherd 2000; Wittmann et al. 2001; George R Jackson et al. 2002). Certains ont utilisé une protéine de fusion tau-GFP dérivée de la protéine bovine tandis que d'autres ont choisi d'exprimer les formes sauvages ou pathogéniques de la tau humaine (Williams, Tyrer, and Shepherd 2000). Tau possède un homologue chez la drosophile et des expériences ont montré que la surexpression de cette protéine endogène a également des conséquences négatives sur le fonctionnement neuronal (Mershin et al. 2004). Comme tau est anormalement phosphorylée dans les NTF, d'autres études ont recherché si les enzymes de phosphorylation ou de déphosphorylation

de tau pourraient intervenir dans la pathologie. Un crible de kinases ou phosphatases potentiellement impliquées dans la régulation de tau a donc été réalisé avec succès *in vitro* (V. M. Lee, Goedert, and Trojanowski 2001). De ces études, on peut relever la kinase PAR-1 (*protease-activated receptor-1*, homologue de MARK chez *Homo sapiens*) qui participe au contrôle de la polarité cellulaire et de l'asymétrie des divisions mitotiques (Nishimura, Yang, and Lu 2004). Chez les mammifères, MARK contrôle la dynamique des microtubules, la polarité cellulaire et la différenciation neuronale. De plus, cette protéine est connue pour se lier aux NTF dans le cerveau des patients atteints de la MA (Drewes et al. 1997; Böhm et al. 1997; Biernat et al. 2002). Chez la drosophile, il a été montré que PAR-1 pouvait initier la phosphorylation de la protéine tau à plusieurs sites, la rendant pathogénique (Nishimura, Yang, and Lu 2004). Ces travaux sont en faveur de l'hypothèse que la phosphorylation de tau est une étape importante dans sa toxicité *in vivo*. Une autre protéine a été identifiée : PSA (PSA/Npepps, *puromycin-sensitive aminopeptidase*) qui catalyse la protéolyse de tau. Une perte de fonction de cette protéine aggrave les neurodégénérescences alors qu'en conditions physiologiques, PSA aurait un effet neuroprotecteur (Karsten et al. 2006). En dépit de ces études, le mécanisme de neurotoxicité induit par la phosphorylation de tau reste encore mal compris. Une des hypothèses est que la phosphorylation excessive de tau pourrait altérer ses interactions avec d'autres protéines qui restent à identifier.

Globalement, les études menées suggèrent une part prépondérante des dysfonctionnements axonaux et synaptiques dans la MA. Ainsi, la suractivation de PAR-1 chez la drosophile provoque des anomalies au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM) : Dlg, homologue de PSD-95, une protéine impliquée dans l'architecture et le fonctionnement de la synapse au niveau post-synaptique, est délocalisée (Zhang et al. 2007; Almeida et al. 2005; Gylys et al. 2004; Roselli et al. 2005). Chez les patients atteints de la MA, on retrouve une diminution comparable de PSD-95 en post-synapse. Les mutants *Psn* (*Presenilin*) ont aussi des défauts d'apprentissage et du fonctionnement synaptique (Knight et al. 2007).

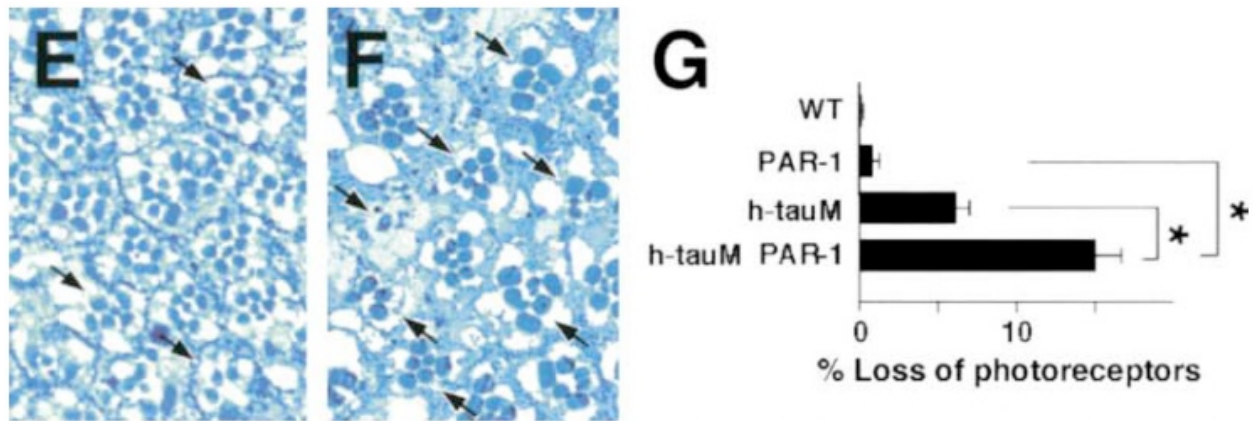


Figure 28 : La surexpression de PAR-1 augmente la toxicité de tau envers les photorécepteurs chez la drosophile.

Cette étude montre que la toxicité de tau est accrue en présence de PAR-1 (E, F et G) ; en effet la coexpression dans les photorécepteurs de PAR-1 et de la tau humaine (h-tauM) induit une plus grande perte (F et G) que lorsque PAR-1 est exprimé seul (G) ou lorsque h-tauM est présent seul (E et G) (Nishimura, Yang, and Lu 2004).

Beaucoup moins d'études ont abordé chez la drosophile l'analyse des formes tardives et non purement génétiques de la MA. Des variants de la protéine Ubiquilin-1 (UBQLN1) sont associés à une augmentation du risque de développement tardif de la MA. En l'absence de son homologue chez la drosophile, Ubqn, on observe une neurodégénérescence (A. Li et al. 2007). De plus, de fortes interactions ont été mises en évidence entre APP, Psn et Ubqn, chez la drosophile, apportant ainsi une évidence de plus en faveur de l'implication d'UBQLN1 dans la pathogenèse des formes tardives de la MA.

4.2 Maladie de Parkinson

Le premier modèle génétique de la MP a été créé chez la drosophile par Feany et Bender en 2000. Cette étude s'était intéressée à l'effet de l'expression neuronale des formes sauvage ou mutantes (A30P et A53T) de l' α -syn, une protéine qui n'a pas d'homologue chez la drosophile. Les auteurs ont montré que cette expression pouvait aboutir à des effets aussi

bien cellulaires que comportementaux. Ainsi, les mouches surexprimant ces différentes formes de l' α -syn présentent après plusieurs semaines une perte du marquage de la TH dans le cerveau (Figure 30), interprétée par les auteurs comme une perte de neurones dopaminergiques, ainsi qu'une accumulation de la l' α -syn dans des inclusions cytoplasmiques comparable aux corps de Lewy. Les mouches développent aussi des déficits moteurs caractérisés par une accélération du déclin des capacités locomotrices au cours du temps (Figure 31). A noter que les capacités locomotrices des drosophiles sont généralement déterminées par leur performance dans un test de géotaxie négative, qui évalue leur capacité à grimper en réponse à un choc mécanique (*startle-induced negative geotaxis*).

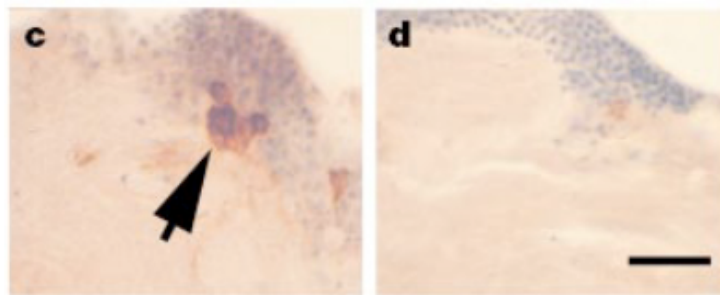


Figure 29 : Perte du marquage de la tyrosine hydroxylase dans des neurones dopaminergiques de drosophile après surexpression de l' α -syn.

La flèche en c) indique des neurones dopaminergiques visibles par un marquage contre la tyrosine hydroxylase qui ne sont plus visibles en d) (Feany and Bender, 2000).

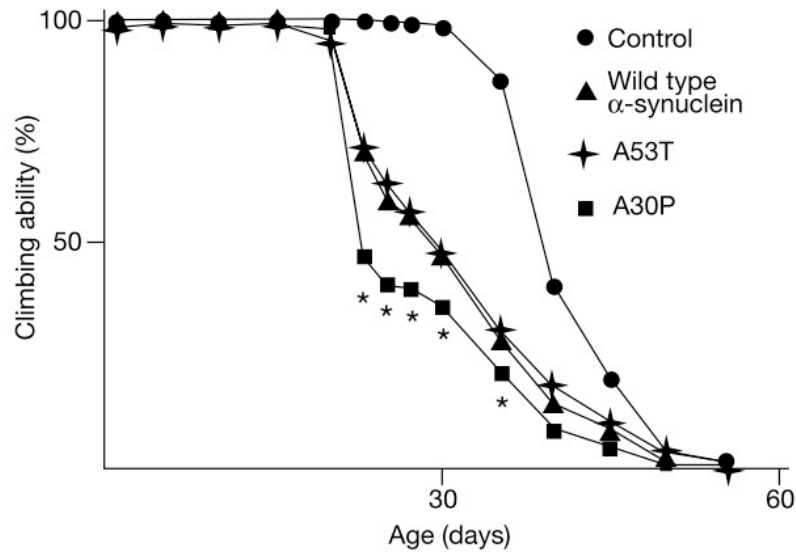


Figure 30 : Perte de locomotion chez les mouches exprimant différentes formes de l' α -syn de façon pan-neuronale.

Cette étude a montré que la perte de l'habilité à grimper le long d'une colonne intervient à environ 40 jours chez des drosophiles contrôles. Lorsqu'on exprime dans tous les neurones les formes sauvages, mutantes A53T et A30P de l' α -synucléine, cette perte intervient beaucoup plus tôt, autour de 25 jours avec une diminution qui semble plus forte dans le cas de l'expression de la forme A30P (Feany and Bender 2000).

A la suite de ce travail initial, d'autres laboratoires se sont intéressés à la modélisation des formes familiales de la MP. Cependant, plusieurs articles témoignent de difficultés à reproduire la perte des neurones dopaminergiques en présence d' α -syn (Whitworth et al. 2005; Pesah et al. 2005), alors que d'autres l'interprètent comme une diminution d'intensités des immunomarquages de la TH ou de la GFP spécifiquement exprimée dans ces neurones. La plupart des études parviennent à reproduire les effets locomoteurs (Cooper et al. 2006; Wassef et al. 2007; Trinh et al. 2008; Botella, Bayersdorfer, and Schneuwly 2008).

Plusieurs modèles visant à étudier l'effet des mutations du gène *lrrk2* ont été effectuées, s'intéressant autant à l'effet de la surexpression des formes humaines sauvage ou mutantes de la protéines LRRK2 qu'à l'effet de la surexpression des orthologues existant chez la drosophile (Z. Liu et al. 2008; Imai et al. 2008; Ng et al. 2009). Ces études trouvent

globalement une perte plus ou moins importante des neurones dopaminergiques de la drosophile en fonction des types de mutants surexprimés. Par exemple, l'expression de la forme sauvage ou de la forme mutée G2019S chez les drosophiles mène à une importante perte des neurones dopaminergiques et des photorécepteurs (Liu et al. 2008), alors que la surexpression des orthologues de drosophile ou des formes mutées Y1699C ou I2020T ne donnent aucune perte significative des neurones DA (S. B. Lee et al. 2007). Cependant, un lien entre le phénomène de traduction des protéines et la perte des neurones dopaminergiques a pu être mis en évidence (Imai et al. 2008). En effet, LRRK2 participe à la phosphorylation de eIF4E, un facteur de traduction et interviendrait dans la voie eIF4E/4E-BP. Lorsque LRRK2 est mutée, cette voie est dérégulée et la traduction également, provoquant une perte progressive au cours du temps des neurones dopaminergiques (Imai et al. 2008).

L'intérêt de l'étude de la MP chez la drosophile a été conforté en particulier par les travaux effectués sur les gènes *parkin* (*park*) et *Pink1* (*PTEN-induced putative kinase 1*), qui ont mis en évidence leur interaction, leur fonction mitochondriale et mis l'accent sur le rôle central des dysfonctionnements mitochondriaux dans la MP. Contrairement à l' α -syn qui n'a pas d'homologue structural chez la drosophile, *park* et *Pink1* sont largement exprimés dans le SNC de la mouche (Horowitz et al. 2001; Bae, Park, and Kang 2003; I. E. Clark et al. 2006; J. Park et al. 2006). Les mutants de drosophile déficients pour *park* ou *Pink1* ont des défauts locomoteurs (J. C. Greene et al. 2005) et des pertes de neurones dopaminergiques (J. Park et al. 2006; J. C. Greene et al. 2003; Cha et al. 2005; Whitworth et al. 2005; C. Wang et al. 2007). De façon intéressante, des défauts similaires ont été observés après surexpression de formes mutées de la parkine présentes chez les patients, suggérant la possibilité d'effets dominants de ces protéines chez l'homme (Sang et al. 2007; Darios et al. 2003). Concernant les effets de l'absence de *park* ou *Pink1* sur la dynamique mitochondriale, les premiers travaux ont montré qu'il est possible de contrebalancer ces effets en se plaçant dans des conditions génétiques favorisant la fission mitochondriale (Poole et al. 2008; J. Park, Lee, and Chung 2009). De plus, il a été montré que *Pink1* et *Parkin* sont tous deux importants

pour isoler les mitochondries du reste du réseau par des interactions avec des protéines considérées comme des moteurs moléculaires (X. Wang et al. 2011). Il serait ainsi possible que les mitochondries défectueuses soient isolées du reste du réseau par ce biais et incorporées ensuite dans des processus de mitophagie (S. Liu et al. 2012).

La drosophile a aussi été utilisée pour modéliser les formes sporadiques de la MP, en exposant les animaux à des toxines environnementales comme la roténone ou le paraquat (PQ), qui sont des pesticides ou herbicides associés à l'apparition de la maladie chez les personnes régulièrement exposées comme les agriculteurs. Coulom et Birman ont ainsi les premiers modélisé la MP en administrant des doses sublétales de roténone par intoxication chronique à des drosophiles. Ce traitement entraîne une perte sélective des neurones DA du cerveau ainsi que des déficits moteurs. Les déficits moteurs sont compensés par l'ingestion de L-dopa, le précurseur direct de la dopamine, ou l'administration d'un agent anti-oxydant, la mélatonine. Par contre, de ces deux agents, seule la mélatonine protège contre les pertes de neurones (Coulom and Birman 2004). De façon comparable, Chaudhury et coll., en 2007, ont montré des pertes des neurones dopaminergiques après intoxication au PQ. Ces auteurs ont aussi montré que le niveau de dopamine influait sur la résistance des drosophiles au PQ. En effet, des mouches mutantes ayant des niveaux plus élevés de DA sont plus résistantes au PQ que des mouches sauvages, et l'inverse est aussi vrai (moins de DA, moins de résistance) (Chaudhuri et al. 2007). Enfin, les mutants d'homologues de gènes impliqués dans la MP comme *park*, *Pink1*, *Lrrk* et *DJ-1 α* sont plus sensibles au PQ ou à la roténone que des drosophiles sauvages, et moins sensibles en général dans des conditions où ces gènes sont surexprimés (Pesah et al. 2005; J. Park et al. 2005; Menzies, Yenissetti, and Min 2005; Meulener et al. 2005; I. E. Clark et al. 2006; Lavara-Culebras and Paricio 2007; Imai et al. 2008).

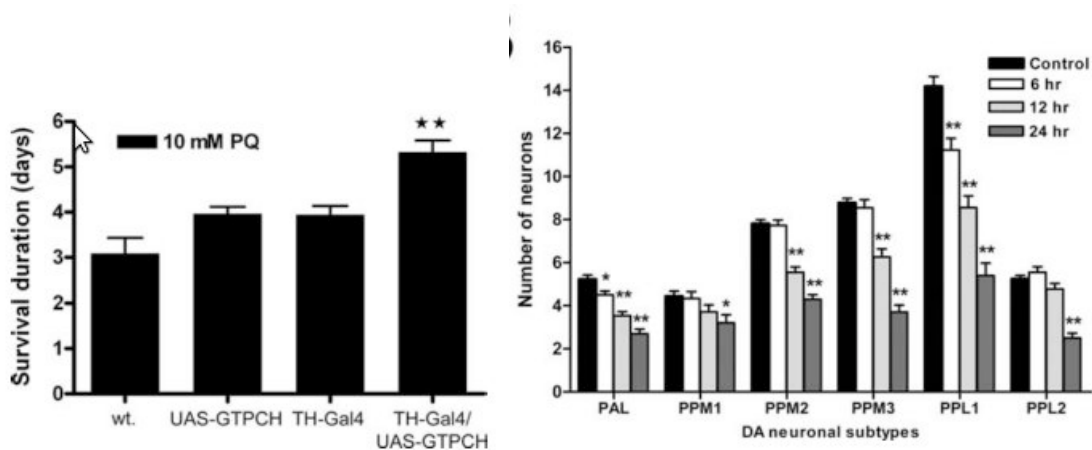


Figure 31 : Le paraquat induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques chez la drosophile.

A. Effet d'une augmentation de la biosynthèse de dopamine sur la résistance des drosophiles au PQ. Ces résultats montrent que lors de l'augmentation de la biosynthèse de dopamine dans les neurones dopaminergiques, on observe une protection des drosophiles contre la toxicité du paraquat. B. Perte progressive des neurones dopaminergiques après intoxication au PQ. Le PQ induit une perte des neurones plus ou moins importante en fonction des clusters dopaminergiques et dépendante du temps d'exposition : on remarque que les neurones DA des clusters PPM1 et PPL2 sont touchés en dernier alors que la perte observée dans les autres clusters est très rapide (Chaudhuri et al. 2007).

OBJECTIFS DE LA THESE

La compréhension des mécanismes qui sous-tendent le dysfonctionnement et la perte progressive des neurones dans les maladies neurodégénératives permettrait sans doute d'améliorer les traitements existants ou d'imaginer de nouvelles approches pour soigner les nombreuses personnes atteintes par ce type de pathologie. L'une de ces maladies est la MP, qui touche environ 100 000 personnes en France et 4 millions dans le monde, et qui, comme on vient de le voir, ne possède toujours pas de vrai remède curatif. De plus, on ne sait pas reconnaître avec certitude les signes précoces de son déclenchement.

La MP détruit les neurones dopaminergiques de la substance noire, l'un des quatre noyaux gris centraux situés à la base du cerveau, encore appelés ganglions de la base, qui participent en particulier au contrôle des mouvements. On considère qu'il existe deux types de causes majeures dans cette maladie : des causes environnementales (pesticides, herbicides, métaux lourds) et des causes génétiques (mutation de gènes), qui pourraient interagir et entraîner le déclenchement de la maladie. Durant ma thèse, j'ai essayé de comprendre, à partir de deux exemples, comment ces différents facteurs altèrent le fonctionnement du système nerveux, en utilisant le modèle de la drosophile.

Les objectifs de ma thèse se divisent donc en deux axes :

- un axe « environnemental » visant à comprendre les effets d'un composé herbicide, le paraquat (PQ), interdit d'utilisation dans l'Union européenne depuis 2007 en raison du lien probable de l'exposition à cette toxine avec la MP, notamment en étudiant l'influence de la dopamine (DA) sur sa neurotoxicité,

- un axe « génétique » visant à comprendre les effets de, l' α -synucléine (α -syn) de types sauvage et mutée (forme A30P), une protéine impliquée dans la MP. Cette étude m'a conduite en particulier à développer une technique de culture *ex vivo* du système nerveux

central (SNC) de drosophile, afin de pouvoir observer les effets progressifs de l' α -syn sur les fonctions de base des neurones dopaminergiques.

MATERIELS ET METHODES :

1 Les drosophiles

Les drosophiles ont été élevées à 25°C en conditions d'humidité constante dans des fioles contenant un milieu nutritif composé d'un mélange de farine de blé, de levure et d'agar auquel est ajouté du méthyl-4-hydroxy-benzoate méthylparabène (E218) qui est un conservateur. Différentes lignées génétiques ont été utilisées pour les tests (le système UAS-Gal4 a été décrit dans l'Introduction, partie III):

Lignées	Caractéristiques
Canton-S	Sauvage aux yeux rouges
W1118	Sauvage aux yeux blancs
Mutantes	
<i>Damb1</i>	Absence du récepteur DAMB
<i>dumb1</i>	Absence du récepteur dDA1
Drivers	Expression
Elav-Gal4	Pan-neuronale
TH-Gal4	Neurones dopaminergiques
5HT-Gal4	Neurones sérotoninergiques
DDC-Gal4	Neurones dopaminergiques et sérotoninergiques
VGlut-Gal4	Neurones glutamatergiques

5'TH-Gal4	Cuticule
PDF-Gal4	Neurones à PDF (<i>Pigment dispersing factor</i>)
UAS	
UAS-THg5	Tyrosine hydroxylase
UAS-RNAi-DAMB	ARN interférent contre DAMB
UAS-DAMB	DAMB
UAS-DVGlutGFP	Transporteur vésiculaire du glutamate marqué avec la GFP
UAS-GCaMP3	Senseur calcique

Les expériences ont été effectuées sur des drosophiles femelles âgées de 7 à 10 jours. Les adultes sont triés la veille des expériences après anesthésie au CO₂. Juste avant le test, les femelles sont anesthésiées par le froid, c'est-à-dire qu'elles sont placées dans une fiole vide dans un bac à glace. Chaque expérience a été effectuée sur environ 100 mouches de même génotype. N représente le nombre d'échantillons de 10 individus, donc lorsqu'on a N=10, cela signifie que 100 drosophiles ont été testées.

2 Tests de survie

Des tests de survie ont été développés et utilisés pour évaluer la résistance des drosophiles de différents génotypes suite à une exposition au PQ. Nous avons utilisé deux méthodes, chacune d'entre elles ayant un avantage propre; l'intoxication par ingestion ou l'application brève de la toxine sur la partie antérieure du corps de drosophiles décapitées. Un des problèmes que nous avons rencontré réside dans la reproductibilité des expériences sur le plan quantitatif. En effet, l'état biologique de départ des drosophiles, ainsi que les conditions climatiques, affectent significativement leur taux de survie après une intoxication au PQ. Nous avons observé qu'il est

important de contrôler avec précision l'âge des mouches, fixé entre 7 à 10 jours, le taux d'humidité et la température. Pour ce faire, les drosophiles intoxiquées entières et décapitées ont été placées dans des boîtes à sucre en condition humide (obtenue en imbibant raisonnablement d'eau distillée une feuille de sopalin pliée en deux placée sur le fond de la boîte), et toujours gardées à une température constante de 25°C dans un incubateur.

- intoxication par ingestion

Les drosophiles ont été réparties par groupe de 10 dans des boîtes de Pétri sur une double couche de papier Whatman imbibée, soit d'une solution de PQ à 20 mM diluée dans du sucrose à 2%, soit de sucrose à 2% seul. Les survivants sont comptés toutes les 30 minutes. Une drosophile vivante présente spontanément des mouvements comme la marche ou le nettoyage (*grooming*) en réponse à un stimulus mécanique tel que le choc de la boîte sur la paille.

- intoxication par application directe

L'utilisation des drosophiles décapitées présente plusieurs avantages. Premièrement, cette technique permet de contrôler avec précision le moment d'assimilation de la toxine, contrairement à la méthode précédente car il est connu que les drosophiles ingèrent peu volontiers un liquide contenant du PQ (Ja et al. 2007). De plus, la drogue agit beaucoup plus rapidement que par la technique d'ingestion et la quantité reçue ne dépend pas du génotype ou du comportement des drosophiles. On compte la quantité de survivants ensuite toutes les 30 minutes. La difficulté de cette méthode réside dans le fait qu'il est plus délicat d'évaluer le moment précis de la mort. Nous avons considéré qu'une drosophile décapitée était morte lorsqu'elle ne répond plus à aucun stimulus mécanique effectué à l'aide d'une pince. Il est à noter que les mouches décapitées peuvent survivre jusqu'à 3 jours en conditions humides et qu'elles possèdent plusieurs comportements spontanés, comme le nettoyage intensif de leurs pattes. Les stimuli mécaniques peuvent entraîner plusieurs types de comportements, allant de la marche au saut en passant par le basculement sur le dos avec mouvement des membres. Il arrive même parfois que suite à un stimulus les drosophiles sans tête s'envolent.

3 Quantification de l'ingestion

Dans le but de savoir si les drosophiles ingéraient effectivement le PQ et ne mourraient pas simplement de déshydratation, j'ai développé au laboratoire une méthode qui permet de visualiser l'ingestion ou non de la toxine mais également de la quantifier (méthode inspirée de celle décrite par Meunier et al, 2007) (Meunier, Belgacem, and Martin 2007). Cette méthode a également été utilisée avec succès pour estimer la quantité ingérée par des drosophiles déficientes en dopamine en présence et en absence de L-dopa dans la nourriture (Figure 34) (Riemensperger et al., 2011).

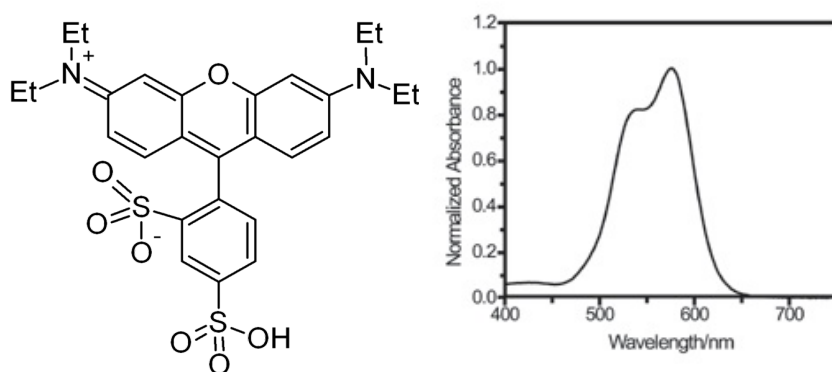


Figure 32 : Formule et spectre d'absorbance de la sulfhorodamine B.

Le spectre d'absorbance indique que le maximum d'absorbance se trouve à 570 nm, longueur d'onde qui est choisie dans le protocole pour mesurer les quantités de colorant ingéré.

Le protocole consiste à placer les drosophiles dans des boîtes de Pétri contenant du papier Whatman imbibé avec la solution choisie additionnée d'un colorant rose non toxique, le sulfhorodamine B (Figure 32). Les drosophiles ont été préalablement privées d'alimentation pendant 1 h (à humidité et température constantes), puis gardées pendant 20 min dans des boîtes de Pétri contenant la sulfhorodamine B diluée à 20 mM dans une solution de sucrose à 2% à laquelle pouvait être ajoutée une drogue ou une toxine. On récupère ensuite les mouches que l'on congèle. A cette étape, on peut déjà évaluer visuellement si la solution a été ingérée grâce à la transparence de la cuticule de l'abdomen sur la face ventrale (Figure 33).

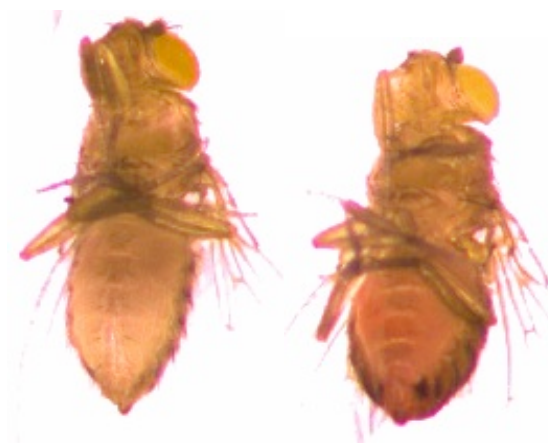


Figure 33 : Visualisation de l'ingestion de nourriture par le colorant alimentaire.

La photo de gauche représente une drosophile qui n'a pas ingéré la solution contenant le sulfhodamine B, alors qu'à droite, l'abdomen de la drosophile ayant ingéré une solution contenant du sulfhodamine B est bien rosé par le colorant.

La suite du protocole consiste tout d'abord à séparer les têtes et ne garder que les corps. Cette étape permet d'éliminer les pigments endogènes contenus en grande quantité dans les yeux. Ensuite, les corps sont broyés dans du PBS (*phosphate-buffered saline*), et le broyat obtenu est centrifugé 5 min à 10 000 rpm. Le surnageant est prélevé, et on y ajoute du chloroforme qui dissout les lipides. La densité optique du surnageant récupéré est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop à 570 nm et elle est proportionnelle à la quantité de nourriture absorbée (Figure 35).

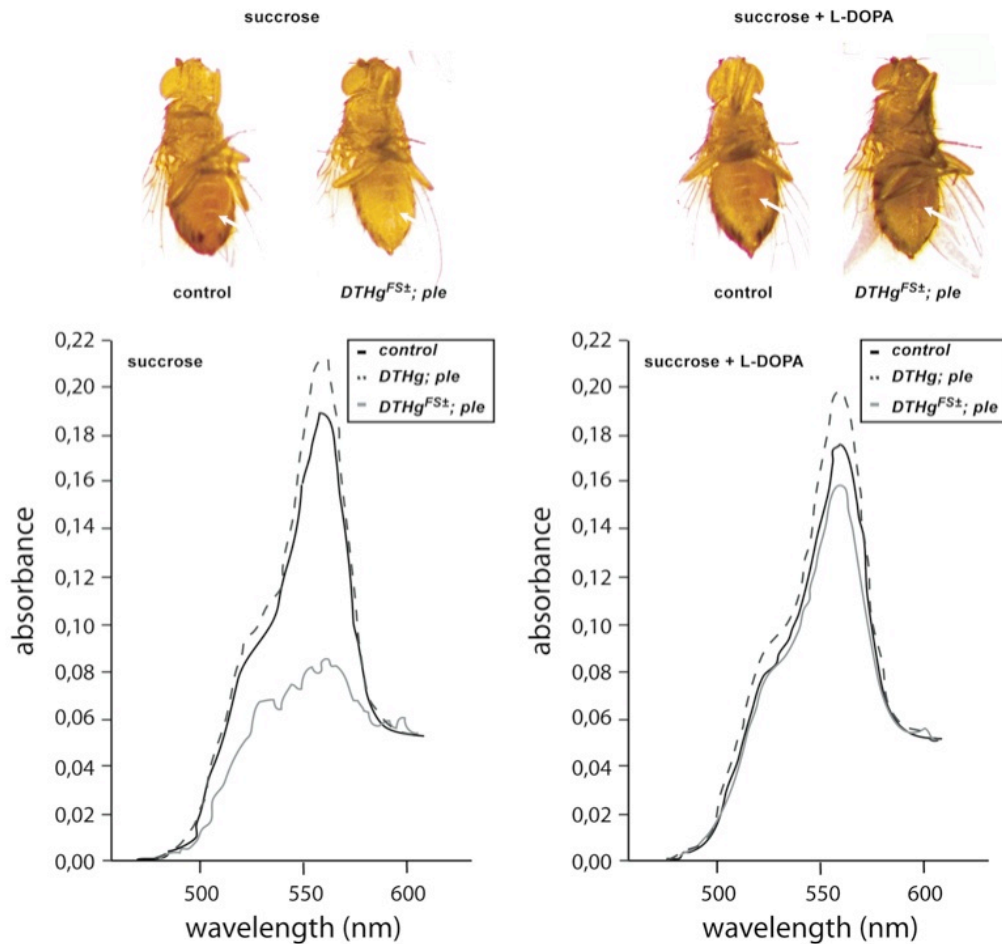


Figure 34 : Type de résultat obtenu (Riemensperger et al., 2011).

A gauche, mesure de l'ingestion de nourriture lors de la présentation de sucrose seul. A droite, mesure de l'ingestion de nourriture lors de la présentation simultanée de sucrose et de L-DOPA. On remarque que les drosophiles déficientes en dopamine ingèrent très peu de sucrose seul alors que la présence de L-DOPA dans la nourriture induit un sauvetage de la consommation de nourriture (voir Annexe).

4 Culture des systèmes nerveux adultes *ex vivo*

Cette méthode a été développée afin de pouvoir étudier les effets physiopathologiques de l' α -synucléine dans des cerveaux vivants maintenus *in vitro*. Les avantages de cette approche permet de suivre un même cerveau tout au long de son vieillissement et pouvoir évaluer l'effet qu'a un facteur comme l' α -syn native ou mutante sur la morphologie des neurones, leur excitabilité ou encore le transport axonal des vésicules.

La technique de culture est inspirée de celle décrite par Ayaz et al., 2008, à laquelle j'ai introduit de nombreuses modifications. Le protocole final consiste en plusieurs étapes qui permettent la survie des systèmes nerveux entiers *ex vivo* pour une durée allant jusqu'à 28 jours (Figure 35).

Les SNC entiers sont disséqués dans un environnement propre mais non stérile, puis mis en culture sur de l'agarose à 0,5 % dans une solution de composition saline proche de l'hémolymphe (Cattaert, Birman, and Bordeaux 2001). Le SNC est alors maintenu immobile entre deux couches d'agarose filtré, une couche fine sur laquelle on pose le cerveau que l'on recouvre ensuite d'une autre couche la plus fine possible. Il faut environ 20 μ l d'agarose au total pour la mise en culture. Cette technique permet l'observation des SNC à l'aide d'un microscope droit. La présence d'agarose en dessous des cerveaux ne permet pas une bonne observation à l'aide d'un microscope inversé, mais la technique peut aisément être améliorée en retirant la couche du dessous. Par contre, cette mise en culture ne permet pas d'effectuer d'expériences d'électrophysiologie car les pipettes d'électrode se bouchent avant même d'avoir atteint le système nerveux. Il existe pour cela d'autres techniques.

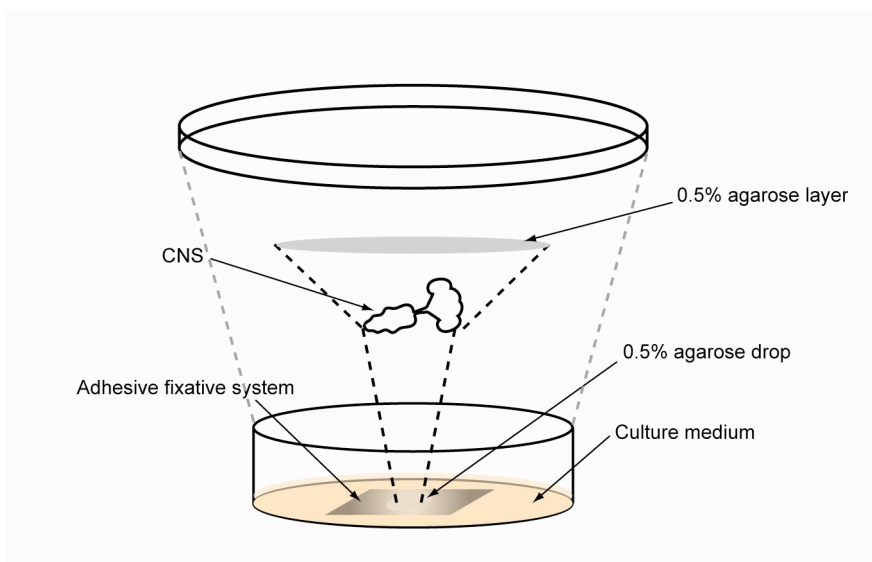


Figure 35 : Système de mise en culture.

Un ruban adhésif perforé est placé au fond d'une boîte de Pétri et stérilisé pendant une nuit dans le l'éthanol à 70°. Une goutte d'agarose à 0.5% est placée dans le trou du ruban adhésif. Le CNS

entier de la drosophile est ensuite placé dans cette goutte après quelques minutes et est recouvert d'une couche très fine d'agarose. 2 mL de milieu de culture est ajouté.

5 Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

J'ai introduit la technique de FRAP dans l'équipe suite au développement de la méthode de mise en culture des SNC entiers. Les résultats seront présentés dans la partie II des Résultats, chapitre 3. Cette technique nous a permis d'évaluer la mobilité des vésicules synaptiques dans les terminaisons des neurones dopaminergiques et glutamatergiques dans le en contexte pathologique du modèle de la MP, en présence d' α -synucléine native ou mutante. Le principe de la technique de FRAP repose sur le fait que les molécules fluorescentes perdent complètement leur fluorescence après un pulse de laser à partir d'une certaine puissance de rayonnement. On choisi alors une zone de la préparation, nommée ROI (*region of interest*), qui va subir ce traitement et dans laquelle on va suivre la cinétique de retour de la fluorescence. Cette technique permet donc de visualiser la mobilité des molécules fluorescentes non irradiées provenant des régions adjacentes situées autour de la ROI, et de mesurer leur vélocité. On peut ainsi estimer par le FRAP la mobilité de diverses molécules, comme la GFP, qui diffusent librement dans les différents compartiments cellulaires, ou des molécules fluorescentes couplées à d'autres protéines libres ou non, qui peuvent être membranaires, ou cytosoliques. Dans notre cas, nous avons utilisé des molécules de GFP couplées au transporteur vésiculaire du glutamate, permettant de visualiser le mouvement des vésicules dans les synapses (Figure 36).

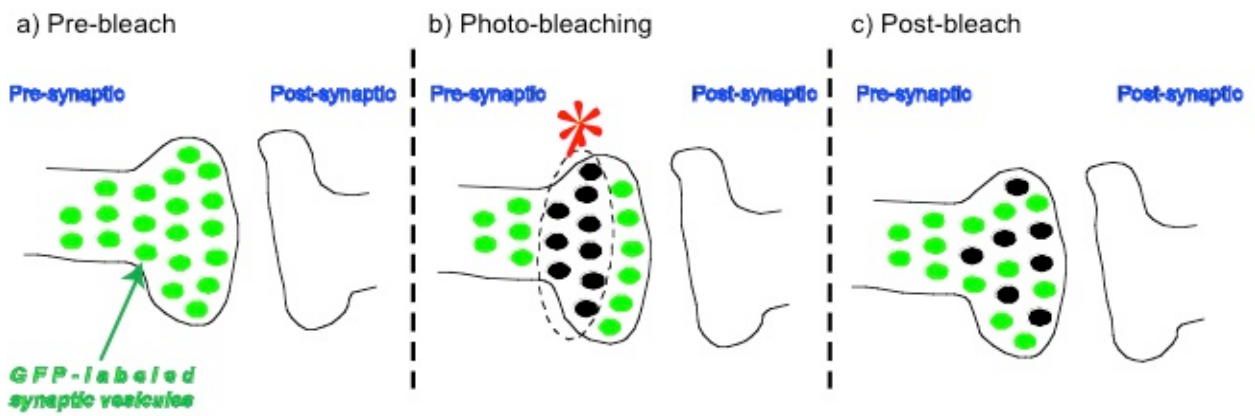


Figure 36 : Principe de la technique de FRAP appliqué à une synapse.

Les vésicules synaptiques fluorescentes n'ayant pas été photoblanchies sont représentées en vert alors que celles qui ont subi le traitement sont en noir. La zone d'intérêt (ROI) est représentée en pointillés surplombé d'une étoile rouge. Les trois panneaux a, b et c représentent le principe du FRAP à trois temps différents : avant le photoblanchiment (Pre-bleach) (a), juste après le photoblanchiment (Photo-bleaching) (b) et plus tard (Post-bleach)(c).

Les résultats ainsi que des méthodes plus détaillées de cette étude sont présentés dans la partie II des résultats, chapitre 3.

6 Imagerie Calcique

J'ai développé l'imagerie calcique sur des SNC en culture dans l'équipe. L'imagerie calcique, c'est-à-dire la mesure relative des taux de calcium intracellulaire par imagerie instantanée en fluorescence, a été effectuée, par principe de faisabilité, dans le cadre d'un travail en collaboration concernant les circuits de neurones impliqués dans le rythme circadien. Les neurones étudiés synthétisent le neuropeptide PDF (*pigment-dispersing factor*). Le but était d'utiliser le senseur calcique GCaMP3 (Figure 37) (Tian et al. 2009) qui a une bien meilleure sensibilité aux flux calciques que les senseurs calciques des générations précédentes, TN-XL ou CaM, qui sont des

senseurs calciques ratiométriques utilisant le principe du FRET (Riemensperger Fiala 2012), et avec lesquels j'avais d'abord obtenu des résultats peu encourageants. La technique de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) repose sur le transfert d'énergie de l'état d'un fluorophore 1 (dit donneur) vers un autre fluorophore 2 (dit accepteur) et ce, uniquement lorsque ce couple de fluorophores est à très proche distance. De plus, pour que le transfert puisse avoir lieu, il faut que le spectre d'émission du donneur chevauche le spectre d'absorption de l'accepteur. Ainsi, les protéines fluorescentes le plus souvent utilisées sont la CFP et la YFP. Dans ces expériences, l'entrée/l'augmentation de calcium dans la cellule entraîne le changement de conformation de la protéine porteuse du fluorochrome donneur, induisant son rapprochement du fluorochrome accepteur et donc le transfert d'énergie. Le principe de ces senseurs réside dans le fait que le ratio de YFP/CFP augmente lorsque le calcium augmente dans la cellule. Le senseur GCaMP ne fait pas intervenir la notion de FRET dans l'imagerie, il n'y a donc pas de perte de temps ni de faiblesse du signal dus à des variations dans les conditions de FRET.

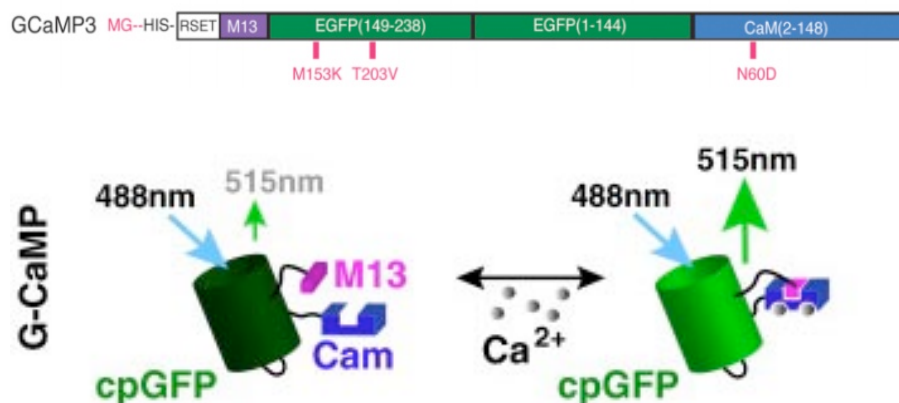


Figure 37 : Organisation et fonctionnement de la sonde GcaMP3.

Pour les expériences préliminaires, qui sont présentées et discutées dans la partie Résultats, j'ai appliqué une solution de KCl à 150 mM pour obtenir une réponse calcique des neurones d'intérêt.

RESULTATS :

Partie I : Travaux sur le modèle paraquat

Chapitre 1: Altérations de la machinerie des microARNs chez les drosophiles intoxiquées au paraquat

Cassar M., Riemensperger T., Thomassin-Bourrel H., Tricoire H., Antoniewski C. et Birman S.

Données supplémentaires

Introduction :

Identifiés au début des années 1990 chez des mutants de *C. elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, and Ambros 1993; Wightman, Ha, and Ruvkun 1993), les microARNs (miARNs) sont des régulateurs essentiels de l'expression des gènes présents chez les animaux et les plantes. Ils se sont vite révélés avoir un rôle important dans le développement et la pathogenèse de maladies, comme des cancers ou encore les maladies neurodégénératives. Les miARNs influencent souvent la réponse des tissus à des stress physiologiques et pathologiques (Leung and Sharp 2010). La structure des miARNs a été très conservée au cours de l'évolution. Les premiers découverts furent lin-4 et lin-7 chez *C. elegans*, dont la mutation induit des défauts importants de développement (R. C. Lee, Feinbaum, and Ambros 1993; Reinhart et al. 2000). Cependant, la majorité des KO des miARNs n'a pas d'effet sur la viabilité des animaux chez *C. elegans* comme chez les souris, suggérant un effet de redondance au sein d'une même famille de miARNs (Miska et al. 2007).

Les miARNs sont des petits ARNs non codants d'une longueur de 21 à 24 nucléotides. Ils sont produits à partir de gènes transcrits et découpés dans le noyau par le complexe de deux enzymes, Drosha et Pasha, en structures en épingle à cheveux de 60-80 nucléotides, appelées pré-miARNs.

Ces pré-miARNs migrent ensuite dans le cytoplasme ou ils sont découpés par l'enzyme Dicer en miARNs double-brin (V. N. Kim, Han, and Siomi 2009). Ceux-ci sont ensuite pris en charge par des protéines de la famille Argonaute (Ago), formant avec d'autres protéines un complexe RISC (*RNA-inducing silencing complex*) dans lequel le miARN devient simple brin. Dans le complexe RISC, les miARNs ciblent les ARNm par interaction imparfaite avec des sites de complémentarité situés dans le 3'UTR, et permettent ainsi selon les cas l'inhibition de la traduction de l'ARNm ciblé ou sa dégradation (Bartel 2009; Djuranovic, Nahvi, and Green 2011). La « machinerie des miARNs » désigne l'ensemble des protéines nécessaires à la production et à l'activité des miARNs.

Quelques études suggèrent qu'il pourrait y avoir un rôle direct ou indirect des miARNs dans la pathogenèse de la MP. Des analyses *post-mortem* des cerveaux de patients ont permis de montrer une modification de l'expression de plusieurs miARNs comme miR-133b (J. Kim et al. 2007) dont la cible est Pitx3, un facteur de transcription impliqué dans le développement des neurones dopaminergiques (Hwang et al. 2003; Nunes et al. 2003; Martinat et al. 2006). miR-133b serait donc impliqué dans l'inhibition de la différenciation des neurones dopaminergiques et son expression est augmentée dans les cerveaux de patients ayant souffert de la MP. Une autre étude a lié l'un des gènes muté dans la MP, codant pour LRRK2, aux miARNs let-7 et mir-184* qui ont pour cibles respectives E2F1 et DP. Dans ce circuit, LRRK2 serait un inhibiteur des deux miARNs, ce qui induirait une surexpression des cibles, pouvant aboutir à la mort cellulaire (Gehrke et al. 2010). Une autre étude a révélé une diminution de l'expression des miR-34b et miR-34c dans les cerveaux affectés par la maladie. L'inactivation de ces miARNs dans un système de cellules en culture induit une mort cellulaire associée à un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation du stress oxydatif (Miñones-Moyano et al. 2011). Cependant, on ne sait toujours pas si l'altération de la machinerie des miARNs est une cause ou une conséquence de la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Dans cette étude préliminaire, nous avons étudié l'effet d'un fort stress oxydatif induit par le paraquat (PQ) sur la machinerie des miARNs dans le SNC de la drosophile.

Matériels et méthodes :

Lignées. Les drosophiles ont été élevées à 25°C en conditions d'humidité constante dans des tubes contenant un milieu nutritif composé de farigél de maïs (Westhove), de levure de bière hydrolysée et d'agar-agar, auquel est ajouté du 4-hydroxybenzoate de méthyle (méthylparabène, E218) qui est un conservateur. Différentes lignées ont été utilisées : les *drivers elav-Gal4* (Lin and Goodman, Neuron 1994) et *TH-Gal4* (Friggi-Grelin et al., 2003) pour cibler respectivement tous les neurones et les neurones dopaminergiques, la lignée *UAS-AutomiR.10F* (C. Antoniewski, Institut Pasteur, non publiée) qui permet l'expression tissu-spécifique d'un biosenseur de la machinerie des biosynthèse des miARNs.

Biosenseur des microARNs. AutomiR est un biosenseur permettant de visualiser en fluorescence l'activité de la machinerie des miARNs dans les types cellulaires où il est exprimé (voir la figure 1). La séquence de ce biosenseur contient deux gènes codant pour des microRNAs dirigés contre l'ARNm de la GFP localisées dans un intron. Cet intron est inséré en amont d'un exon codant l'eGFP (*enhanced GFP*). Lorsque la machinerie des miRs fonctionne correctement, la GFP ne s'exprime pas des cellules ciblées, alors que lorsque la machinerie est perturbée, la traduction de la GFP n'est plus inhibée par les miRs et la GFP apparaît donc dans les cellules. Cet outil a été mis au point dans le laboratoire de Christophe Antoniewski à l'institut Pasteur.

Intoxications au paraquat. Deux types d'intoxications ont été réalisés : l'intoxication par ingestion et celle par application directe sur drosophiles décapitées. Ces méthodes sont décrites dans la partie Matériels et Méthodes de la thèse. Les drosophiles traitées étaient des femelles adultes âgées de 7 à 10 jours. Pour l'ingestion, le PQ 20 mM a été dilué dans du sucrose 2% et les drosophiles disséquées après 24 h. Pour l'application directe, le PQ 80 mM a été dilué dans du Ringer et les drosophiles disséquées au bout de 2 h.

Immunomarquages. Les systèmes nerveux centraux (SNC) (cerveau et corde nerveuse ventrale) des drosophiles ont été disséqués dans une solution de Ringer sans calcium, puis fixés à l'aide de paraformaldéhyde à 4% pendant 2 h sur glace avec agitation. Les SNC sont ensuite lavés 3 fois 20 min dans du PBS 1X contenant 0,5% de Triton X-100 puis incubés dans une solution de

blocage pendant 2 h à température ambiante sous agitation. Les SNC sont ensuite incubés avec les anticorps primaires toute la nuit en chambre froide sous agitation: anti-TH de souris dilué au 1/50 (Immunostar) et anti-GFP de lapin au 1/250 (Sigma). Les SNC sont ensuite lavés 3 fois 20 min dans du PBS 1X puis incubés en présence des anticorps secondaires dilués au 1/250 pendant 2 h à température ambiante : anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 555 et anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Les SNC sont ensuite lavés 3 fois 20 min avec du PBS 1X puis montés entre lame et lamelle dans du Mowiol. Les images ont été obtenues sur un microscope confocal Nikon A1R.

Résultats :

L'ingestion du PQ altère la machinerie des miARNs dans les neurones dopaminergiques

La première étape de ce travail a été d'observer si l'intoxication par ingestion au PQ était capable d'induire un dérèglement de la machinerie des miARNs. Le biosenseur AutomiR (Fig. 1) a donc été exprimé dans les neurones dopaminergiques avec le driver *TH-Gal4* (Fig. 2). Après 24 h, on constate une augmentation de la fluorescence de la GFP dans les cerveaux des drosophiles (Fig., 2D-F) comparé aux cerveaux contrôles n'ayant pas été exposés au PQ (Fig. 2A-C). Un immunomarquage contre la tyrosine hydroxylase (TH) co-localise de façon claire avec la GFP dans certaines parties du cerveau (Fig. 2F, flèches). Ces observations indiquent que l'ingestion du PQ induit une altération de la machinerie des miARNs dans les neurones dopaminergiques.

La machinerie des microARNs est inactivée spécifiquement dans les neurones dopaminergiques après intoxication au PQ

Nous avons ensuite tenté de reproduire ces résultats avec notre seconde méthode d'intoxication au PQ par application directe sur le haut du thorax de drosophiles décapitées (Fig. 3). Dans ces expériences, l'AutomiR a cette fois été exprimé dans tous les neurones avec *elav-Gal4*. Il est intéressant de noter qu'on observe déjà la présence de la GFP dans certaines cellules dans la corde nerveuse ventrale dans le contrôle non traité au PQ (Fig. 3A-C et G-I). Ces résultats pourraient être une conséquence de ce que les têtes de ces drosophiles sont coupées deux

heures avant la dissection des SNC. Certains neurones de la corde ventrale, normalement innervés par le cerveau, auraient alors le temps d'entrer en apoptose. 2 h après l'application du PQ, on observe d'abord une importante diminution du marquage globale de la TH dans les systèmes nerveux (Fig. D, F et J, L), lié au stress oxydatif induit par le PQ. On observe également une apparition de la GFP sélectivement dans les neurones dopaminergiques. De façon remarquable, un fort signal de la GFP coïncide avec un faible signal de la TH (Fig. 3D-F et J-L), ce qui suggère que l'altération de la machinerie des miARNs s'accompagne d'une diminution de l'expression de la TH ou d'une accélération de sa dégradation.

Conclusions :

Ces résultats suggèrent que la machinerie de biosynthèse de miARNs peut être altérée par différents facteurs dans ce modèle : 1) la décapitation des mouches qui induit apparemment le dysfonctionnement de certains neurones qui auraient besoin des projections en provenance du cerveau, 2) l'application même du PQ qui génère un stress oxydatif et cause des pertes des neurones dopaminergiques et semble induire une diminution du marquage contre la TH. Dans le premier cas, les neurones dopaminergiques ne sont pas concernés. Dans le deuxième cas, seuls les neurones dopaminergiques sont concernés.

Le PQ semble donc avoir une action sélective sur les neurones dopaminergiques, quel que soit le mode d'administration du pesticide. Ceci est en accord avec d'autres observations effectuées dans l'équipe (voir le chapitre suivant). Il reste à déterminer si l'altération de la machinerie des miARNs joue un rôle actif dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques induit par le stress oxydatif ou si elle n'en est que la conséquence.

References :

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–33.

doi:10.1016/j.cell.2009.01.002

Djuranovic, S., Nahvi, A., & Green, R. (2011). A parsimonious model for gene regulation by

miRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6017), 550–3. doi:10.1126/science.1191138

Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N., & Lu, B. (2010). Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature*, 466(7306), 637–41. doi:10.1038/nature09191

Hwang, D.-Y., Ardayfio, P., Kang, U. J., Semina, E. V., & Kim, K.-S. (2003). Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain research. Molecular brain research*, 114(2), 123–31.

Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W. B., Voronov, S. V., Murchison, E., Hannon, G., et al. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5842), 1220–4. doi:10.1126/science.1140481

Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2), 126–39. doi:10.1038/nrm2632

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–54.

Leung, A. K. L., & Sharp, P. A. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell*, 40(2), 205–15. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.027

Martinat, C., Bacci, J.-J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W. B., Newman, A. H., Cha, J. H., et al. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2874–9. doi:10.1073/pnas.0511153103

Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A. L., Lau, N. C., Hellman, A. B., McGonagle, S. M., Bartel, D. P., et al. (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS genetics*, 3(12), e215. doi:10.1371/journal.pgen.0030215

Miñones-Moyano, E., Porta, S., Escaramís, G., Rabionet, R., Iraola, S., Kagerbauer, B., Espinosa-Parrilla, Y., et al. (2011). MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Human molecular*

genetics, 20(15), 3067–78. doi:10.1093/hmg/ddr210

Nunes, I., Tovmasian, L. T., Silva, R. M., Burke, R. E., & Goff, S. P. (2003). Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4245–50. doi:10.1073/pnas.0230529100

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., et al. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–6. doi:10.1038/35002607

Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–62.

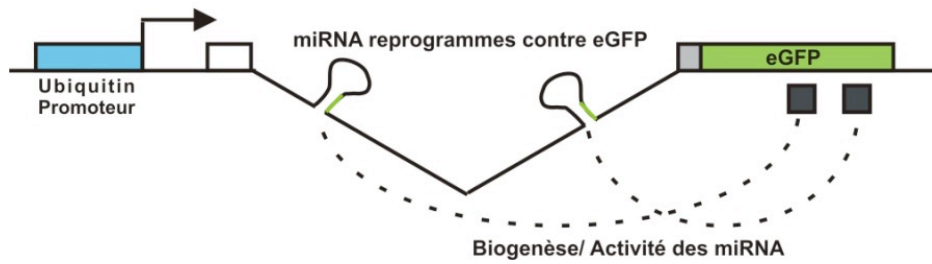


Fig. 1 : Structure du biosenseur AutomiR. Des miARNs spécifiques codés dans l'intron du transgène inhibe l'expression de la GFP lorsque la machinerie de biosynthèse et d'activité des miARNs est fonctionnelle. Si cette machinerie est inactivée, la cellule devient fluorescente.

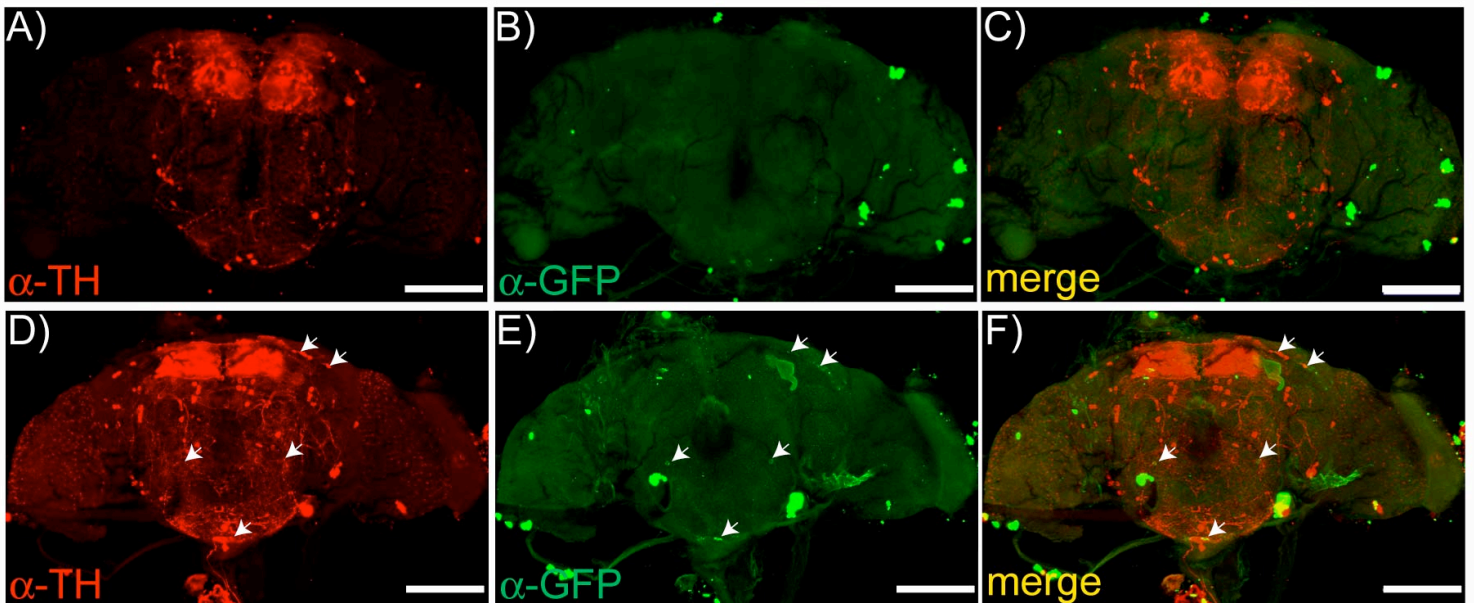


Fig. 2. Effet d'une ingestion de PQ sur la machinerie des miARNs dans les neurones dopaminergiques du cerveau adulte. A-C) Drosophiles *TH>AutomiR* contrôles non exposées au PQ A) Marquage avec un anticorps anti-tyrosine hydroxylase spécifique des neurones dopaminergiques. B) Immunomarquage anti-GFP. C) Superposition des deux marquages précédents. On notera l'absence de signal spécifique de le GFP dans les neurones. D-F) Drosophiles *TH>AutomiR* nourries avec du PQ pendant 24 h. D) Immunomarquage anti-tyrosine hydroxylase. E) Immunomarquage anti-GFP. F) Superposition des deux marquages. En présence

de PQ, la GFP s'exprime dans les neurones dopaminergiques, parfois de façon très visible (flèches). Barre d'échelle : 100 μ m.

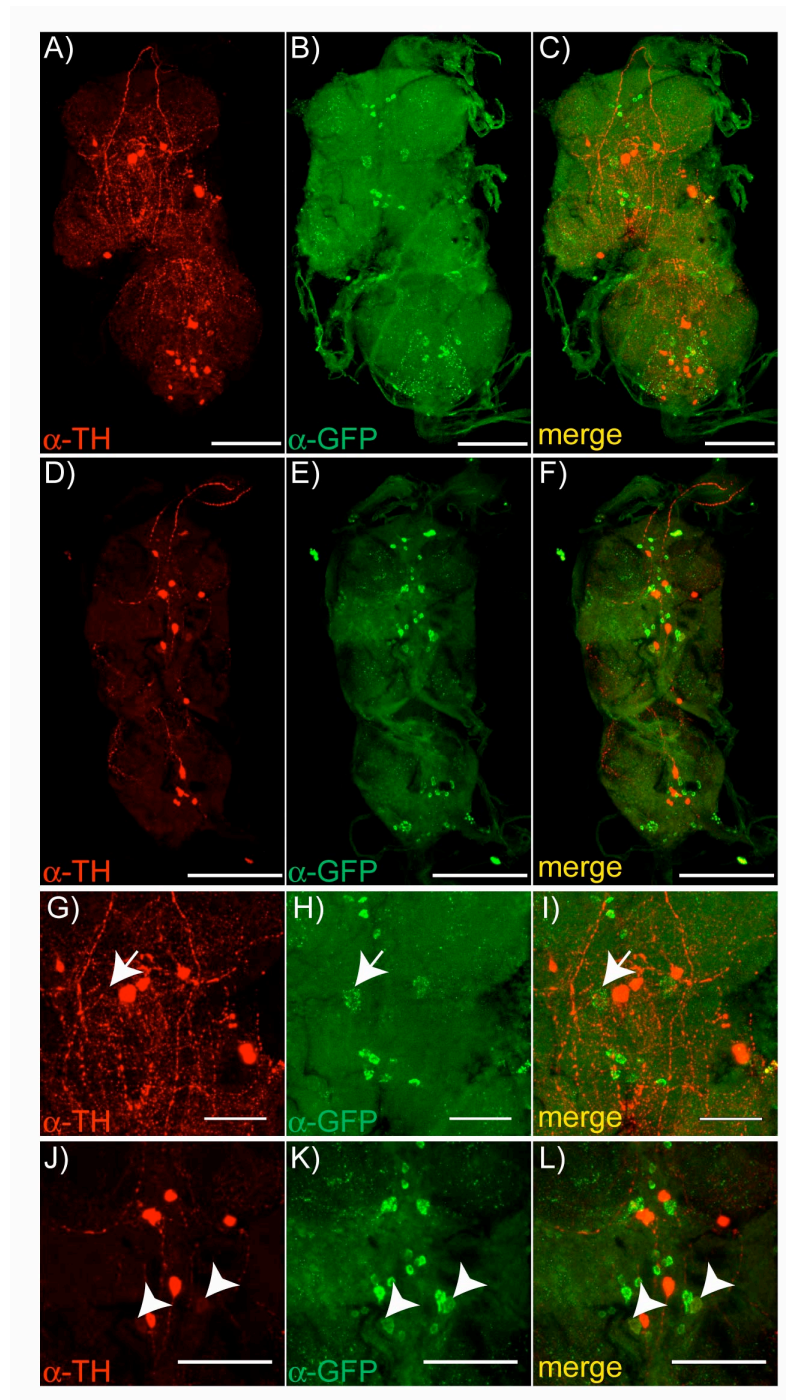


Fig. 3 : Effet de l'application directe du PQ sur la machinerie des miARNs dans les neurones de la corde nerveuse ventrale de drosophile. A-C) Drosophiles *elav>Automir* contrôles non exposées au PQ. G-I) Aggrandissement de la partie centrale du ganglion mésothoracique. On remarque dans le contrôle que la GFP est présente dans des neurones qui ne sont pas dopaminergiques (flèches). D-E) Drosophiles *elav>Automir* exposées au PQ. J-L) Aggrandissement de la partie

centrale du ganglion mésothoracique. On remarque que la GFP s'exprime dans des neurones dopaminergiques montrant un marquage anti-TH de faible intensité. Barres d'échelle : 100 μm .

Chapitre 2 : Modulation de la neurotoxicité du paraquat par un récepteur dopaminergique chez la drosophile

Marlène Cassar, Thomas Riemensperger, Thomas Rival, Hélène Coulom, Magali Iché-Torres, Kyung-An Han and Serge Birman

Article soumis

Résumé

Le stress oxydatif est suspecté d'être l'une des causes majeures de la perte des neurones dans les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (MP). Des toxines environnementales comme le paraquat (PQ), un herbicide massivement utilisé de part le monde, augmente fortement le risque de contracter la MP. D'après l'étude épidémiologique du NIEHS, *Farming and Movement Evaluation*, les personnes exposées au PQ ou à la roténone ont 2,5 fois plus de chances de déclarer la MP (Tanner et al., 2011). Le PQ génère du stress oxydatif en étant soumis à un cycle rédox à un seul électron (réduction de PQ^{2+} en un radical cation PQ^+ par une NAD(P)H déshydrogénase, transfert rapide de l'électron du PQ^+ réactif à O_2 , ce qui produit un ion superoxyde et régénère le PQ^{2+} initial) (Bus and Gibson 1984; Drechsel and Patel 2008). La neurotoxicité du PQ passerait, semble-t-il, également par l'activation de la NADPH oxydase 1 (Nox1), une enzyme génératrice d'ions superoxydes présente dans les neurones dopaminergiques (Infanger, Sharma, and Davisson; Cristóvão et al. 2009) et dont la forme activée s'accumulerait dans le noyau en condition de stress oxydatif (Choi et al. 2012).

Les ions superoxydes produits par le PQ peuvent cibler des zones variables des cellules telles que le noyau, les mitochondries et le réticulum endoplasmique, augmenter le stress dans ces organites et induire leurs dysfonctionnements, pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. Le fait que les neurones dopaminergiques de la substance noire sont les principales cibles dans la MP suggère

que la dopamine (DA) elle-même et d'autres facteurs spécifiques de ces neurones jouent un rôle important dans la sélectivité des atteintes de cette maladie.

Chez la drosophile, le PQ est très utilisé, à la fois comme générateur de stress oxydant dans le cadre des études sur les mécanismes du vieillissement (Jones et al. 2009) et pour reproduire les effets cellulaires de la MP. En effet, de précédents auteurs ont montré que l'intoxication au PQ provoque une dégénérescence et une perte sélective des neurones dopaminergiques du cerveau (Chaudhuri et al. 2007). La DA est abondante dans le cerveau des drosophile et les neurones dopaminergiques présentent des projections qui rayonnent sur l'ensemble du SNC. La drosophile possède des récepteurs dopaminergiques de type D₁ et de type D₂ (comme décrit dans l'Introduction à la thèse, partie III). Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle d'un récepteur dopaminergique de type D₁, DAMB (alias DopR2). En effet, ce récepteur a une particularité : outre l'activation de la PKA via l'augmentation de l'AMP cyclique, sa stimulation entraîne la libération dans le cytoplasme du Ca²⁺ stocké dans le reticulum endoplasmique.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au mécanisme de la neurotoxicité du PQ chez la drosophile. Précédemment, Chaudhuri et al. (2007) avaient montré que des variations dans les taux de DA influent sur la résistance des drosophiles au PQ. Ici, nous avons observé : 1) qu'une augmentation de la biosynthèse de la DA dans le SNC provoque une diminution de l'expression du récepteur DAMB, 2) que la surexpression de ce récepteur est létale à des stades pupaux tardifs lorsqu'il est exprimé dans tous les neurones ou dans les neurones dopaminergiques, 3) que ce récepteur n'est pas spécifique de la tête et des corps pédonculés mais qu'il est également exprimé dans la corde ventrale nerveuse des drosophiles, 4) que l'inactivation de ce récepteur dans les neurones glutamatergiques protège les drosophiles contre la neurotoxicité du paraquat. Ces résultats nous ont conduit à proposer un modèle selon lequel la suractivation de DAMB en présence de PQ induirait une suractivation des neurones glutamatergiques, en particulier du fait de la libération du calcium présent dans le RE. Cette suractivation provoquerait une libération accrue excitotoxique de glutamate, accélérant la rupture du SNC et la mort des drosophiles.

Des effets similaires chez les mammifères sont connus. En effet, dans la maladie de Huntington par exemple, on sait que la suractivation des récepteurs dopaminergiques de type D1 peut

entraîner une dégénération des neurones striataux en partie par une augmentation d'entrée de Ca^{2+} dans ces cellules (Tang et al. 2007).

— Dans cette étude, j'ai réalisé expérimentalement une grande partie des tests de survie des drosophiles entières ou décapitées, les expériences de RT-PCR et qRT-PCR, ainsi que les immunomarquages pratiqués sur les cordes nerveuses ventrales.

A dopamine receptor mediates paraquat neurotoxicity in *Drosophila*

Marlène Cassar¹, Thomas Riemensperger^{1,#}, Thomas Rival,² Hélène Coulom,² Magali Ich  -Torres,² Kyung-An Han³ and Serge Birman^{1,2,*}

¹*Genetics and Physiopathology of Neurotransmission, Neurobiology Unit, CNRS, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, F-75231 Paris cedex 5, France.*

²*Developmental Biology Institute of Marseilles-Luminy, CNRS, Universit   de la Méditerranée, Campus de Luminy Case 907, F-13288 Marseille cedex 9, France*

³*Department of Biological Sciences, Border Biomedical Research Center, University of Texas at El Paso, El Paso, TX 79968, USA*

#Current address : Molecular Neurobiology of Behaviour, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institute, Georg-August-University of Goettingen, Schwann-Schleiden Research Center, Julia-Lermontowa-Weg 3, 37077 Goettingen, Germany.

*Correspondence to: serge.birman@espci.fr

Tel.: +33-140 79 58 35 – Fax: +33-140 79 47 57

Words included: *Abstract (245), Introduction (490), Results and Discussion (1656), Materials and Methods (594)* — 3 figures, 1 table

Supporting information: *SI Materials and Methods*, 4 supplemental figures

Abstract

Oxidative stress (OXS), i.e. the uncontrolled accumulation of reactive oxygen species, is a major cause of cell damage, aging and death and an etiological or aggravating factor of major human diseases such as cancer, heart failure and Parkinson's disease (PD), the most common neurodegenerative movement disorder. Environmental free radical generators such as the

herbicide paraquat (PQ, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) have been associated with PD and the dramatic loss of midbrain dopaminergic neurons that is characteristic of this disease. PQ is thus frequently used in animal models, like *Drosophila*, to mimic PD symptoms and dopaminergic neurodegeneration. Intriguingly, *Drosophila* mutants with higher dopamine (DA) levels are more resistant than wild type to PQ-mediated OXS while mutants with low DA are strongly vulnerable to this toxin. DA is an essential neuromodulator in *Drosophila* that controls various behaviors by binding to specific membrane receptors. Here we show that long-term increase in DA synthesis protects adult flies against PQ neurotoxicity through specific downregulation of DAMB, a D₁-family DA receptor that signals through Ca²⁺ and cAMP. Either treatment with D₁-specific antagonists, *DAMB* mutation, or targeted inactivation of *DAMB* selectively in CNS glutamatergic neurons markedly increased *Drosophila* resistance to PQ. Furthermore, we show that overexpression of the DAMB receptor in dopaminergic, but not in serotonergic or glutamatergic neurons, is lethal for the flies. Thus, DA signaling becomes neurotoxic when OXS increases in the *Drosophila* CNS. Further studies of the DAMB-mediated toxicity pathway could lead to novel insights for understanding DA-related disorders in humans.

Introduction

OXS plays a central role in aging and major age-related human diseases (1) such as cancer (2), heart failure (3), neurodegenerative syndromes (4, 5) and specifically Parkinson's disease (PD) (6-8). PD is a multifactorial movement disorder resulting from dysfunction and loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (9-11). No treatment is currently known that could halt or slow down the progression of dopaminergic neuron death in this disorder. PD and related diseases are generally sporadic but familial cases were described. Several of the ~15 PARK genes whose mutations cause various forms of Parkinsonism were shown to be involved in mitochondrial quality control and OXS pathway Guzman (7). Oxidation of DA itself or its metabolites produces reactive radicals and quinones (12) that can damage cells and interact with PD-related proteins. This combined to physiological features of the nigrostriatal dopaminergic neurons like prominent Ca^{2+} entry through L-type channels might account for the specific vulnerability of these neurons in PD (6, 13).

Environmental free radicals generators like the herbicide paraquat (PQ) (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) or the pesticide rotenone were associated with dopaminergic neuron degeneration in PD (14). Their mechanisms of cytotoxicity are distinct and not fully established *in vivo* (15-17). Rotenone is a high-affinity specific inhibitor of mitochondrial complex I whereas PQ generates superoxide anion radicals through reiterated redox cycling and electron transfer by reacting with molecular oxygen and NADH-dependent oxidoreductases (18). These neurotoxicants have been used to model PD in rodents (16, 19) and *Drosophila* (20-23). In mice, PQ-induced DA nigrostriatal neurodegeneration involves oxidative damage (24). In *Drosophila*, ingestion of PQ induced locomotor deficits and concomitant brain dopaminergic neuron loss (21). Melatonin, a potent hydroxyl radical scavenger, protects flies against rotenone and PQ (22, 25).

Dopamine is an essential neuromodulator in *Drosophila* that plays a crucial role in control of various behaviors (26). DA released from neurons interacts with specific G protein-coupled dopamine receptors, e.g. dDA1 and DAMB (27) that are strongly expressed the mushroom bodies and control arousal and memory in flies (28, 29). In spite of DA pro-oxidant properties, mutations

that elevate DA levels surprisingly confer protection against PQ-induced OXS in *Drosophila*, whereas mutations that diminish DA pools increase susceptibility (21). Here, by overexpressing the dopamine-synthesizing enzyme tyrosine hydroxylase (TH) in the *Drosophila* nervous system, we show that long-term increase in DA synthesis in neurons protects adult flies against PQ neurotoxicity. We find that enhanced resistance correlates with downregulation of a specific DA receptor, DAMB, in glutamatergic neurons, where this receptor is normally expressed. This suggests that DAMB mediates PQ neurotoxicity in naïve flies by promoting abnormal glutamate (Glu) release and excitotoxicity in the CNS. Accordingly, short-term (2 h) overstimulation of either DA or Glu-releasing neurons with the Ca²⁺-permeant thermal sensor channel dTRPA1 markedly sensitized adult flies to PQ. Furthermore, we show that DAMB expression in dopaminergic neurons is lethal for the fly, confirming that the Ca²⁺/cAMP signaling mediated by this DA receptor can be potentially neurotoxic.

Results and Discussion

Long-term increase in DA synthesis protects against PQ neurotoxicity

Survival of the wild type adult *Drosophila* fed on a sucrose solution containing 20 mM PQ is at most 72 h, with 60% of the flies apparently dead after 24 h (Fig. 1A). This effect was consistently observed among various control strains (Fig. S1). Because dietary PQ strongly inhibits food intake in flies (30), we also used decapitated adult *Drosophila* to apply the drug directly to the ventral nerve cord (VNC) and so bypass feeding and digestive tract absorption (31). Decapitated *Drosophila* survive well for three days when conserved in a moist environment at 25°C. They maintain a normal standing posture and a vigorous righting response, and they can respond to mechanical or pharmacological stimulations with grooming and coordinated locomotion (31). Interestingly, death occurred much faster when PQ was directly applied to the VNC of decapitated *Drosophila*. A single 5 s application of a drop of 20 mM or 80 mM PQ killed 60-70% of the headless flies in 6 h and 2 h, respectively (Fig. 1B). The faster kinetics of lethality, compared to oral ingestion, suggests that PQ-induced organism death involves neurotoxicity and CNS disturbance in *Drosophila*.

In *Drosophila* like in mammals, the TH enzyme is required and rate-limiting for DA production in the CNS (26). To increase DA synthesis in an otherwise wild-type background, we overexpressed genomic *Drosophila TH* (*DTHg*), from the late embryonic stage and thereafter, under transcriptional control of the *TH-GAL4* driver (32). This significantly increased the resistance of adult flies to PQ toxicity compared to the wild type, both after oral ingestion (Fig. 1C) or application of the drug to the VNC (Fig. 1D). Increasing TH expression in DA neurons could conceivably protect against PQ-induced DA depletion and so preserve their functionality. However and surprisingly, ectopic expression of *DTHg* selectively in serotonergic neurons with the *TRH-GAL4* driver (Fig. S2), which can force these cells to produce and release DA, also resulted in significant protection against PQ (Fig. 1B,C). Therefore, increased DA production either in DA or serotonin neurons was sufficient to enhance PQ resistance. This suggests that the critical factor for protection is not the level of DA but rather the amount of DA released in the CNS. Consistent with this interpretation, flies overexpressing the vesicular monoamine transporter (VMAT) in DA neurons, a genetic way to increase DA release, showed enhanced resistance to PQ (23).

Enhanced resistance correlates with downregulation of the DA receptor DAMB

Released DA interacts with specific membrane receptors. We tested if this interaction plays a role in control of PQ neurotoxicity. DA receptor antagonists were applied together with PQ to the nerve cord of decapitated *Drosophila*. Application of either SKF-83959 or SKF-83566, two specific antagonists of the D₁ receptor subtypes, markedly enhanced resistance of the flies against PQ. 90 min after PQ application, about 80% of the headless flies survived in the presence of these antagonists compared to 40% for controls (Fig. 1E). In contrast, eticlopride, a specific antagonist of D₂ receptors previously shown to be effective in *Drosophila* (31), had no effect on PQ toxicity (Fig. 1E). Therefore, short-term specific blockade of D₁ receptor signaling efficiently protects against PQ poisoning in *Drosophila*. Two D₁-like receptors are known in *Drosophila*: dDA1 and DAMB. We determined the PQ resistance of *Damb*¹, a viable null *DAMB* mutant, and *dumb*², a hypomorphic dDA1 mutant. After 2 hours of PQ poisoning, the survival rate of headless *Damb*¹ flies was found to be significantly higher than that of the wild type Canton S (CS) flies (60% and 35%, respectively, $p < 0.05$) (Fig. 1F). In contrast, survival of *dumb*² flies was similar to CS (Fig. 1F). *Damb*¹ flies were also much more resistant than the wild type when PQ intoxication was carried out by dietary

ingestion (85% mutant survivors after 24 h compared to 38% for CS) (Fig. 1G). Therefore, DAMB signaling appears specifically involved in PQ-induced lethality in *Drosophila*.

The comparable protective effects of *DAMB* inactivation and long-term enhanced DA suggested that *DAMB* expression could be altered in a compensatory manner by TH overexpression. To test this hypothesis, we measured *DAMB* expression levels by RT-PCR and qRT-PCR. When TH was overexpressed either in dopaminergic or serotonergic neurons, *DAMB* mRNA was strongly downregulated in adult fly heads (Fig. 1H,I). This indicates that the amount of DA synthesized and released during *Drosophila* development exquisitely regulates *DAMB* expression. Thus, various treatments or mutations that result in downregulation or elimination of *DAMB* (application of D₁ antagonists, *DAMB* mutation or long-term increase in DA synthesis), lead to a common phenotype of increased PQ resistance.

***DAMB* inactivation in glutamatergic neurons protects against PQ neurotoxicity**

The *DAMB* receptor is known to be expressed in the mushroom bodies (28, 33), a fly brain center involved in the regulation of associative learning and sleep. Since *DAMB* inactivation enhanced the resistance of decapitated flies when PQ was applied to the nerve cord (Fig. 1F), we looked for *DAMB* expression in the VNC as well. The structure of the VNC with the relative localization of glutamate (Glu) and DA-expressing neurons is schematically depicted in Fig. 2A. We performed RT-PCR experiments and found that the *DAMB* mRNA is indeed detectable both in head and thorax of adult wild type *Drosophila* but not as expected in the *Damb*¹ mutant (Fig. 2B). *DAMB*-specific immunostaining confirmed that this receptor is widely expressed in the VNC, and markedly in areas containing Glu neuron cell bodies (Fig. 2C). No immunostaining was observed in the VNC of *Damb*¹ flies (Fig. 2D). We used the *VGlut-GAL4* driver (Fig. S3) to express mCD8::GFP selectively in Glu neurons. Double staining for *DAMB* and GFP confirmed that VNC Glu neurons are *DAMB*-immunoreactive (Fig. 2E-G). We then expressed a *VGlut::GFP* fusion protein, a synaptic vesicle marker (Fig. S3), in Glu neurons to localize their terminals in the nerve cord. This revealed that Glu nerve endings are widely distributed in the VNC neuropil in regions that also contain dense DA neuron arborizations (Fig. 2H-J). VNC Glu terminals may originate from axon collaterals of the motor neurons or from descending axons from brain interneurons (34-36). Taken together, the previous results suggest that *DAMB* signaling in VNC Glu neurons may contribute to

PQ-induced lethality. To test this hypothesis, *DAMB* was selectively inactivated in Glu neurons by targeted RNA interference (RNAi) with the *VGlut-GAL4* driver. This led to a significant increase in fly survival under PQ poisoning compared to controls, either after application of the drug to headless flies or by dietary ingestion (Fig. 3A,B). In contrast expression of the double-stranded *DAMB* RNAi in DA neurons had no effect on PQ susceptibility (Fig. 3C). These results indicate *DAMB* signaling in the VNC Glu neurons as an important mediator of PQ toxicity in *Drosophila*.

Then, we overexpressed the *DAMB* receptor in specific neural cell types in the absence of PQ to test if this could challenge *Drosophila* survival. Expression in glutamatergic neurons where *DAMB* is normally expressed, in serotonergic neurons or in glial cells was without effect. In contrast, we observed that *DAMB* expression in all neurons or in dopaminergic neurons resulted in fly death before the adult stage (Table 1). Lethality occurred just before adult eclosion from pupae. This suggests that *DAMB* signaling can be strongly neurotoxic to flies, particularly when combined with the presence of a pro-oxidant molecule like DA in dopaminergic neurons or PQ after environmental intoxication.

Short-term stimulation of Glu- or DA-releasing neurons increases PQ susceptibility

DAMB activation elevates intracellular cAMP and Ca^{2+} levels (37), which in turn have a potentiating effect on neuronal activity and neurotransmitter release. *dTRPA1* is a Ca^{2+} -permeant thermal sensor channel that depolarizes neurons when ambient temperature is raised above 25°C (38). We expressed *dTRPA1* in Glu-releasing neurons with *VGlut-GAL4* to assess whether Glu release modulates PQ toxicity. Decapitated adults were treated with PQ, or alternatively plain Ringer's solution, and then incubated at 31°C for 2 h. We observed that expression of *dTRPA1* in glutamatergic neurons did not trigger paralysis of the flies at 31°C, indicating that neuromuscular junctions were still functional under this condition. In the absence of PQ treatment, most of the *dTRPA1*-expressing flies survived the two hours of neuronal overstimulation (80% compared to 93% for control flies that did not express *dTRPA1*). In contrast, survival of PQ-intoxicated *dTRPA1*-expressing flies was reduced by half compared to control flies containing *UAS-dTRPA1* or *VGlut-GAL4* alone (Fig. 3D).

Similarly, overstimulation of DA neurons with dTRPA1 for 2 h strongly decreased resistance of the flies against PQ (Fig. 3E): less than 10% survived compared to 40-50% for the *UAS-dTRPA1* and *TH-GAL4* controls, respectively. This last result contrasts with the protective effect observed in adult flies after long-term increase of DA synthesis in the CNS during development (see Fig. 1B,C). Therefore, short-term stimulation of DA neurons in the adult CNS does aggravate the detrimental effects of OXS in flies. Long-term increase in DA release would adaptively compensate for this effect by downregulation of the DAMB receptor.

A model for PQ neurotoxicity in *Drosophila*

Overall, our results suggest that PQ neurotoxicity in *Drosophila* depends on the activation state of a DA receptor, DAMB, whose signaling becomes neurotoxic in the presence of pro-oxidant molecules. We thus propose a model (Fig. S4), in which short-term increase in dopaminergic signaling sensitizes flies to PQ neurotoxicity and compensatory mechanisms are adaptively induced during sustained exposure by modulating downstream DAMB signaling. DA release under acute OXS in naïve flies would overactivate DAMB, triggering neuronal dysfunction and Glu excitotoxicity, causing finally organism death. Similarly in mammals, it is known that an increase in intracellular Ca^{2+} can potentiate the damaging effects of OXS in neurons (6, 13, 39) and that D_1 DA receptor overactivation can trigger striatal neuron degeneration in diseases such as multiple system atrophy and Huntington's disease, in part by increasing Ca^{2+} influx in these cells (40-43). Further studies of the DAMB-mediated neurotoxicity pathways in *Drosophila* could thus lead to novel insights for understanding DA-related disorders in humans.

Materials and methods

Please refer to *SI Materials and Methods* for further details and references of the procedures.

***Drosophila* culture and strains.** Fly stocks were raised at 25°C on standard corn meal-yeast-agar medium supplemented with methyl-4-hydroxy-benzoate as a mold protector, under 12 h/12 h light/dark cycle and ca. 70% humidity. The following *Drosophila* strains were used: Canton S or w^{1118} as wild type; *y, w* for germ-line transformation; *UAS-DTHg* (44) to express the *Drosophila* TH gene; *UAS-VGlu::GFP* (this report) to express GFP fused to the *Drosophila* vesicular Glu transporter gene (*VGlu*), used as a synaptic vesicle marker; *TH-GAL4* (32), *TRH-GAL4* (this

report) and *VGlut-GAL4* (this report) that drive expression selectively in DA, serotonin and Glu neurons, respectively; *Damb*¹, a null mutant of the DopR2/DAMB receptor generated by P element imprecise excision (28, 45); *dumb*², a hypomorphic DopR/dDA1 allele (46); *UAS-DAMB* (provided by Kyung-An Han); *UAS-DAMB RNAi (UAS-DAMB-IR)* (Vienna *Drosophila* RNAi center, stock #v3391); *UAS-dTrpA1* (38) (described in Result section), *UAS-mCD8::GFP* and *UAS-GFP-S65T* (Bloomington *Drosophila* Stock Center).

Paraquat Intoxication and survival score. PQ treatment was performed on 7 to 10-day old adult females either by dietary ingestion or by direct application of the drug to decapitated flies. For dietary ingestion, 10 flies were incubated at 25°C in a 2-inch (5.2 cm) diameter Petri dish containing two layers of Whatman paper soaked with 600 µl PQ (methyl viologen, Sigma) diluted in 2% (wt/vol) sucrose or sucrose only for controls. To avoid dehydration, dishes were enclosed in a plastic box layered with moist paper. 9 or 10 Petri dishes were independently tested for each condition. Survival was monitored after 24 or 48 h. We generally used 20 mM PQ in ingestion experiments, which yielded ~40% survivors after 24 h for wild type flies (Figure 1A).

For direct application, flies were anaesthetized on ice for 10 min and their heads were cut off with 7-mm blades spring scissors (Fine Science tools). 10 decapitated bodies (named “headless flies”) were transferred to a 2-inch Petri dish and allowed to recover for a few minutes until they stood on their legs. A 5 µl droplet of PQ diluted in *Drosophila* Ringer’s solution (in mM: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.8 CaCl₂, 0.5 Na₂HPO₄, 0.35 KH₂PO₄, pH 7.4 adjusted with 150 Na₂HPO₄) or Ringer’s only for controls, was applied for 5 s with a P10 Pipetman to the VNC at the anterior notum as described (31). The same droplet was successively used for 10 flies. Then flies were incubated at 25°C in the same conditions as those intoxicated by ingestion. A concentration of 80 mM PQ was generally used that gave ~35 % wild type survivors after 2 h. Flies were considered as dead when they laid on the side or back and did not react to a light mechanical stimulus. Survival was monitored every 30 min and graphs present survival at 2 h unless otherwise noted.

DA receptor antagonist were purchased from Tocris and added to the PQ solution at the following concentrations: SKF83959, 50 µM; SKF83566, 5 mM; eticlopride, 5 mM. For *in vivo* neuron activation, 30 decapitated *Drosophila* expressing *dTrpA1* in neuronal subsets were intoxicated as

usual at room temperature and then immediately incubated at 31°C for 2 h before fly survival was scored.

Statistical Analyses. Results are expressed as mean \pm SEM of 9 or 10 independent determinations. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), using ANOVA with *post hoc* Tukey–Kramer or Student's *t* test. Statistical significance in figures: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, n.s not significant.

Acknowledgments

We thank Philippe Ascher, Daniel Cattaert, Jay Hirsh and André Klarsfeld for helpful discussions and/or comments on the manuscript. We thank Hugo Bellen for kind gift of the anti-synaptotagmin antibody. This work was supported by grants from the Fondation de France, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC), Agence Nationale de la Recherche (ANR), ESPCI and CNRS to SB and NIH/NCRR 5G12RR008124 to KAH. The Association France-Parkinson, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Fondation Pierre-Gilles de Gennes provided post-doctoral salaries (to TRm). Doctoral fellowships were provided by the Université Pierre-et-Marie Curie (to MC), Université de la Méditerranée and FRM (to HC and TRv).

References

1. Lenaz G (2012) Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* 942:93–136.
2. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49:1603–1616.
3. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2181–90.
4. Karbowski M, Neutzner A (2012) Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol* 123:157–171.
5. Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795.

6. Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468:696–700.
7. Schapira AH, Gegg M (2011) Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinsons Dis* 2011:159160.
8. Zhou C, Huang Y, Przedborski S (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 1147:93–104.
9. Forno LS (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *J NeuropatholExpNeurol* 55:259–272.
10. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB (2011) Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 6:193–222.
11. Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909.
12. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 55:659–665.
13. Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D (2009) Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron* 62:218–229.
14. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR *et al.* (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119:866–872.
15. Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI (2010) Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact* 188:289–300.
16. Przedborski S, Ischiropoulos H (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 7:685–693.

17. Ramachandiran S, Hansen JM, Jones DP, Richardson JR, Miller GW (2007) Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol Sci* 95:163–171.
18. Bus JS, Gibson JE (1984) Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* 55:37–46.
19. Cannon JR, Greenamyre JT (2010) Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog Brain Res* 184:17–33.
20. Bayersdorfer F, Voigt A, Schneuwly S, Botella JA (2010) Dopamine-dependent neurodegeneration in Drosophila models of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 40:113–119.
21. Chaudhuri A, Bowling K, Funderburk C, Lawal H, Inamdar A, Wang Z, O'Donnell JM (2007) Interaction of genetic and environmental factors in a Drosophila parkinsonism model. *J Neurosci* 27:2457–2467.
22. Coulom H, Birman S (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in Drosophila melanogaster. *J Neurosci* 24:10993–10998.
23. Lawal HO, Chang HY, Terrell AN, Brooks ES, Pulido D, Simon AF, Krantz DE (2010) The Drosophila vesicular monoamine transporter reduces pesticide-induced loss of dopaminergic neurons. *Neurobiol Dis* 40:102–112.
24. McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA (2005) Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *J Neurochem* 93:1030–1037.
25. Bonilla E, Medina-Leendertz S, Diaz S (2002) Extension of life span and stress resistance of Drosophila melanogaster by long-term supplementation with melatonin. *Exp Gerontol* 37:629–638.
26. Riemensperger T, Isabel G, Coulom H, Neuser K, Seugnet L, Kume K, Iche-Torres M, Cassar M, Strauss R, Preat T *et al.* (2011) Behavioral consequences of dopamine deficiency in the Drosophila central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:834–839.

27. Blenau W, Baumann A (2001) Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 48:13–38.
28. Berry JA, Cervantes-Sandoval I, Nicholas EP, Davis RL (2012) Dopamine is required for learning and forgetting in *Drosophila*. *Neuron* 74:530–542.
29. Lebestky T, Chang JS, Dankert H, Zelnik L, Kim YC, Han KA, Wolf FW, Perona P, Anderson DJ (2009) Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. *Neuron* 64:522–536.
30. Ja WW, Carvalho GB, Mak EM, de la Rosa NN, Fang AY, Liong JC, Brummel T, Benzer S (2007) Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8253–8256.
31. Yellman C, Tao H, He B, Hirsh J (1997) Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4131–4136.
32. Friggi-Grelin F, Coulom H, Meller M, Gomez D, Hirsh J, Birman S (2003) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol* 54:618–627.
33. Han KA, Millar NS, Grotewiel MS, Davis RL (1996) DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 16:1127–135.
34. Bicker G, Schafer S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1988) Glutamate-like immunoreactivity in identified neuronal populations of insect nervous systems. *J Neurosci* 8:2108–2122.
35. Daniels RW, Gelfand MV, Collins CA, DiAntonio A (2008) Visualizing glutamatergic cell bodies and synapses in *Drosophila* larval and adult CNS. *J Comp Neurol* 508:131–152.
36. Sombati S, Hoyle G (1984) Glutamatergic central nervous transmission in locusts. *J Neurobiol* 15:507–516.

37. Feng G, Hannan F, Reale V, Hon YY, Kousky CT, Evans PD, Hall LM (1996) Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 16:3925–3933.
38. Hamada FN, Rosenzweig M, Kang K, Pulver SR, Ghezzi A, Jegla TJ, Garrity PA (2008) An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* 454:217–220.
39. Nicholls DG (2008) Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1147:53–60.
40. Chen J, Rusnak M, Lombroso PJ, Sidhu A (2009) Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades. *Eur J Neurosci* 29:287–306.
41. Cyr M, Beaulieu JM, Laakso A, Sotnikova TD, Yao WD, Bohn LM, Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11035–11040.
42. Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S (2008) Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 28:10090–10101.
43. (Tang et al. 2007) Tang TS, Chen X, Liu J, Bezprozvanny I (2007) Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 27:7899–7910.
44. Friggi-Grelin F, Iché M, Birman S (2003) Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis* 35:175–184.
45. Selcho M, Pauls D, Han KA, Stocker RF, Thum AS (2009) The role of dopamine in *Drosophila* larval classical olfactory conditioning. *PLoS One* 4:e5897.
46. Kim YC, Lee HG, Han KA (2007) D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J Neurosci* 27:7640–7647.

Figures

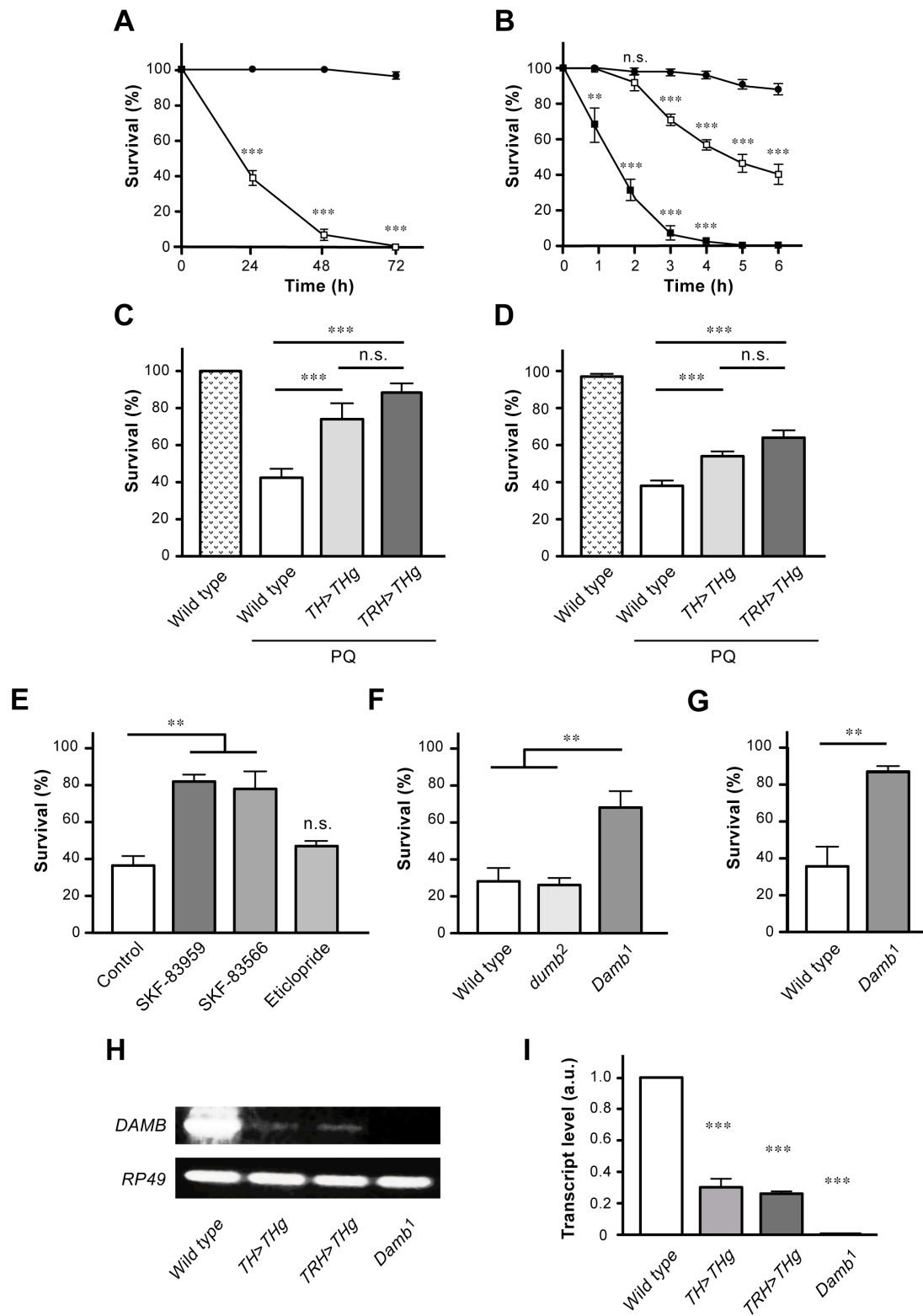


Fig. 1. Downregulation of the dopamine receptor DAMB protects *Drosophila* against paraquat-induced oxidative stress. (A, B) Survival rate of wild type Canton S *Drosophila* after dietary ingestion of PQ (A) or direct application of the drug to the VNC of decapitated flies (B). PQ concentrations: 0 (closed circles), 20 mM (open squares) and 80 mM (closed squares). (C, D) Protection by TH overexpression. (C) Survival of wild type flies fed for 24 h with 20 mM PQ, compared to *TH-GAL4; UAS-THg* flies overexpressing *TH* in DA neurons (*TH>THg*), and *TRH-GAL4; UAS-THg* flies expressing *TH* ectopically in serotonergic neurons (*TRH>THg*). (D) Survival rate of decapitated flies 2 h after application of 80 mM PQ to the VNC. Same genotypes as in C. (E) Effect of DA receptor antagonists. Survival of decapitated flies was monitored 1h30 after PQ was applied either alone (control) or together with D₁ antagonists SKF-83959 or SKF-83566, or D₂ antagonist eticlopride. A protection was observed with the D₁-specific antagonists. (F) PQ susceptibility of decapitated D₁-like DA receptor mutants. Whereas survival rate of *dumb*² is comparable to wild type, *Damb*¹ shows higher resistance to PQ. (G) Survival of *Damb*¹ flies after dietary ingestion of PQ is similarly increased compared to wild type. Conditions of PQ intoxication in F,G were similar to D,C, respectively. (H, I) TH overexpression decreases *DAMB* transcript level in adult flies. Semi-quantitative (H) and quantitative (I) RT-PCR experiments show that *DAMB* mRNA is absent in *Damb*¹ mutant and much reduced after long-term *TH* overexpression in DA (*TH>THg*) or serotonergic (*TRH>THg*) neurons.

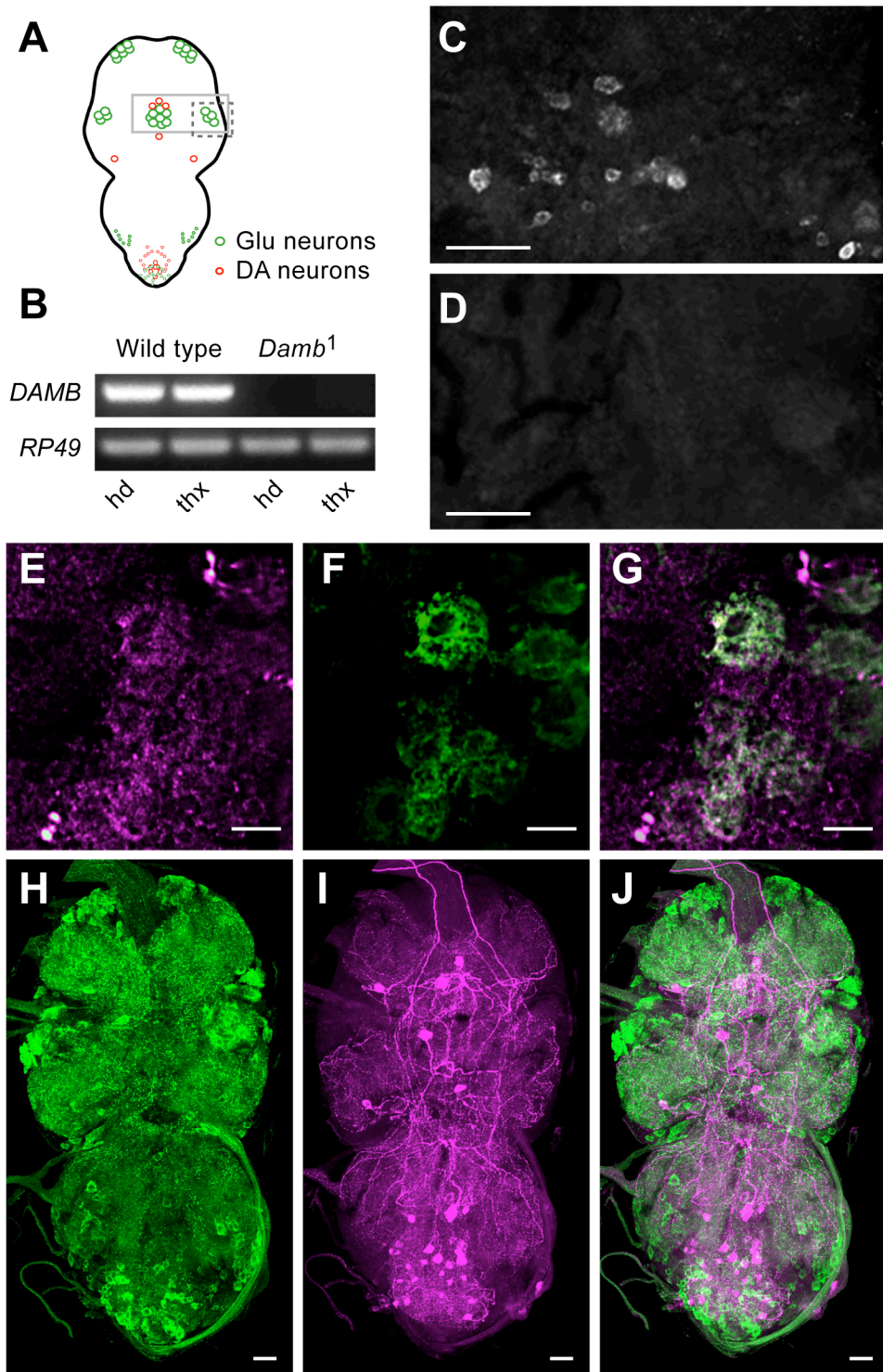


Fig. 2. The dopamine receptor DAMB is expressed in glutamatergic neurons of the ventral nerve cord. (A) Sketch of Glu (*green circles*) and DA (*red circles*) neuronal cells in the VNC. Circles represent neuronal cell bodies. *Gray rectangle* indicates the region magnified in panels C-D and *dashed rectangle* in panels E-G, respectively. (B) Semi-quantitative RT-PCR experiment showing that *DAMB* is expressed both in head and thorax of wild-type Canton-S flies, and is absent from

both tissues in *Damb*¹ mutant. (C) Presence of DAMB immunoreactivity in adult VNC of wild type flies. DAMB is expressed in particular in neuronal cell bodies that possibly correspond to glutamatergic motor neurons. (D) No DAMB immunoreactivity was detected in VNC of *Damb*¹ mutant. (E-G) Double staining with anti-DAMB (*magenta*) and anti-GFP (*green*) antibodies in VNC of *VGlut-GAL4; UAS-mCD8::GFP* flies. (E) anti-DAMB, (F) anti-GFP, (G) merge. Cell bodies of Glu motor neurons express DAMB. (H-J). Double staining with anti-TH (*magenta*) and anti-GFP (*green*) antibodies in VNC of *VGlut-GAL4; UAS-VGlut::GFP* flies. (H) anti-GFP, (I) anti-TH, (J) merge. DA varicosities and Glu nerve endings are widely distributed in overlapping regions of the VNC neuropil. Scale bars: (C,D) 25 μ m, (E-G) 5 μ m, (H-J) 10 μ m.

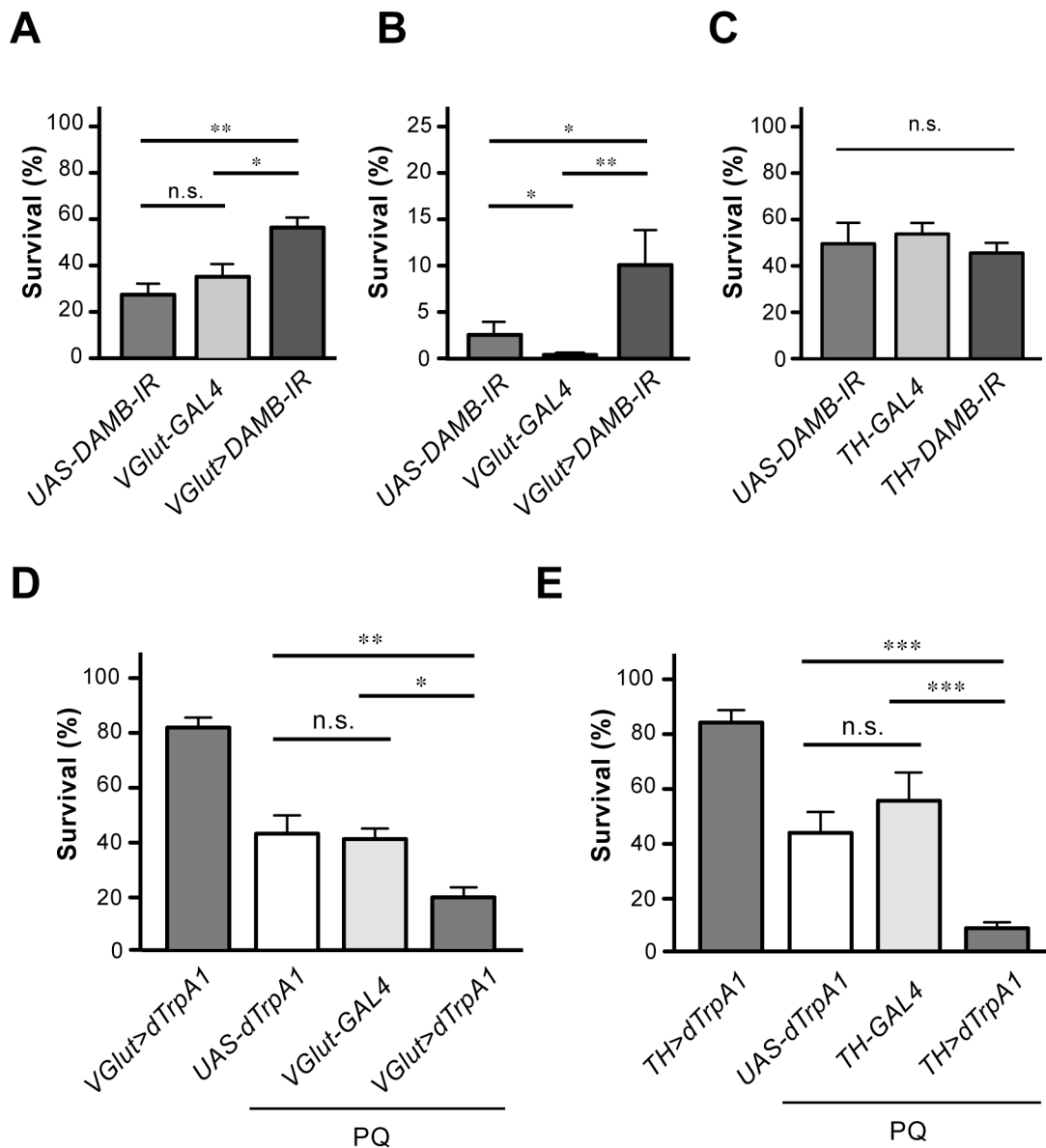


Fig. 3. Targeted *DAMB* inactivation in glutamatergic neurons enhances PQ resistance. (A,B) Survival of either decapitated (A) or intact (B) flies 2 h and 48 h, respectively, after PQ poisoning, is prolonged for *VGlut-GAL4*; *UAS-DAMB-IR* *Drosophila* that express *DAMB* double-stranded interfering RNA selectively in Glu neurons, compared to control flies carrying *VGlut-GAL4* or *UAS-DAMB-IR* alone. (C) Survival of decapitated *TH-GAL4*; *UAS-DAMB-IR* flies is similar to controls. (D) Survival of decapitated *VGlut-GAL4*; *UAS-dTrpA1* (*VGlut>dTrpA1*) *Drosophila* incubated for 2 h at 31°C in the presence of PQ is significantly decreased compared to the same flies incubated at 31°C without PQ or similarly treated control flies carrying either *VGlut-GAL4* or *UAS-dTrpA1* alone.

(E) *In vivo* stimulation of DA neurons. Same experiment as in A with *TH-GAL4; UAS-dTrpA* flies. Overactivation of DA neurons markedly decreased *Drosophila* survival after PQ application.

Table 1. *DAMB* expression in specific neuronal subsets causes adult fly death.

Driver names	Driver patterns	Adult females		Adult males ^b
		Cy	Cy ^{+a}	Cy
<i>elav-GAL4</i> ^b	all neurons	15	0 (0)	9
<i>repo-GAL4</i>	glial cells	17	11 (39.3)	12
<i>Ddc-GAL4</i> ^b	dopaminergic/serotonergic	27	0 (0)	36
<i>TH-GAL4</i>	dopaminergic	49	0 (0)	63
<i>TRH-GAL4</i>	serotonergic	56	45 (44.5)	48
<i>VGlut-GAL4</i>	glutamatergic	26	38 (59.4)	23

Female *UAS-DAMB/CyO* flies were mated to male flies with hemizygous or homozygous insertions of the indicated *GAL4* drivers. Survival was determined by scoring the relative number of Cy⁺ adult flies in the progeny. *DAMB* receptor did not challenge *Drosophila* survival when it was expressed either in glial cells, or selectively in glutamatergic or serotonergic neurons. In contrast, *DAMB* expression in all neurons, or restricted to cholinergic or dopaminergic neurons, is lethal for adult flies.

^a Percent of Cy⁺ progeny are in *italics*.

^b Because *elav-GAL4* and *Ddc-GAL4* are inserted on the X chromosome and male driver flies were used for the crosses, their male progeny did not inherit the *GAL4* transgene.

Supplementary Materials for

A dopamine receptor involved in memory causes *Drosophila* death under oxidative stress

Marlène Cassar, Thomas Riemensperger, Thomas Rival, Hélène Coulom, Marie Leboss e, Yu Yan, Kyung-An Han, Magali Ich e-Torres, and Serge Birman*

*correspondence to: serge.birman@espci.fr

Materials and Methods

Figs. S1 to S4

Materials and Methods:

***Drosophila* Culture and strains.** Fly stocks were raised at 25 C on standard corn meal-yeast-agar medium supplemented with methyl-4-hydroxy-benzoate as a mold protector, under 12 h/12 h light/dark cycle and ca. 70% humidity. The following *Drosophila* strains were used: Canton S or *w*¹¹¹⁸ as wild type; *y, w* for germ-line transformation; *UAS-DTHg* (28) to express the *Drosophila* TH gene; *UAS-VGlu::GFP* (this report) to express GFP fused to the *Drosophila* vesicular Glu transporter gene (*VGlu*), used as a synaptic vesicle marker; *TH-GAL4* (16), *TRH-GAL4* (this report) and *VGlu-GAL4* (this report) that drive expression selectively in DA, serotonin and Glu neurons, respectively; *Damb*¹, a null mutant of the DopR2/DAMB receptor generated by P element imprecise excision (11, 29); *dumb*², a hypomorphic DopR/dDA1 allele (30); *UAS-DAMB* (provided by Kyung-An Han); *UAS-DAMB RNAi* (*UAS-DAMB-IR*) (Vienna *Drosophila* RNAi center, stock #v3391); *UAS-dTrpA1* (31)

(described in Result section), *UAS-mCD8::GFP* and *UAS-GFP-S65T* (Bloomington *Drosophila* Stock Center).

Paraquat Intoxication and survival score. PQ treatment was performed on 7 to 10-day old adult females either by dietary ingestion or by direct application of the drug to decapitated flies. For dietary ingestion, 10 flies were incubated at 25°C in a 2-inch (5.2 cm) diameter Petri dish containing two layers of Whatman paper soaked with 600 µl PQ (methyl viologen, Sigma) diluted in 2% (wt/vol) sucrose or sucrose only for controls. To avoid dehydration, dishes were enclosed in a plastic box layered with moist paper. 9 or 10 Petri dishes were independently tested for each condition. Survival was monitored after 24 or 48 h. We generally used 20 mM PQ in ingestion experiments, which yielded ~40% survivors after 24 h for wild type flies (Figure 1A).

For direct application, flies were anaesthetized on ice for 10 min and their heads were cut off with 7-mm blades spring scissors (Fine Science tools). 10 decapitated bodies (named “headless flies”) were transferred to a 2-inch Petri dish and allowed to recover for a few minutes until they stood on their legs. A 5 µl droplet of PQ diluted in *Drosophila* Ringer’s solution (in mM: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.8 CaCl₂, 0.5 Na₂HPO₄, 0.35 KH₂PO₄, pH 7.4 adjusted with 150 Na₂HPO₄) or Ringer’s only for controls, was applied for 5 s with a P10 Pipetman to the VNC at the anterior notum as described (15). The same droplet was successively used for 10 flies. Then flies were incubated at 25°C in the same conditions as those intoxicated by ingestion. A concentration of 80 mM PQ was generally used that gave ~35 % wild type survivors after 2 h. Flies were considered as dead when they laid on the side or back and did not react to a light mechanical stimulus. Survival was monitored every 30 min and graphs present survival at 2 h unless otherwise noted.

DA receptor antagonist were purchased from Tocris and added to the PQ solution at the following concentrations: SKF83959, 50 µM; SKF83566, 5 mM; eticlopride, 5 mM. For *in vivo* neuron activation, 30 decapitated *Drosophila* expressing *dTrpA1* in neuronal subsets were

intoxicated as usual at room temperature and then immediately incubated at 31°C for 2 h before fly survival was scored.

Statistical Analyses. Results are expressed as mean \pm SEM of 9 or 10 independent determinations. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), using ANOVA with *post hoc* Tukey–Kramer or Student's *t* test. Statistical significance in figures: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, n.s not significant.

DNA constructs and transformation. To generate the *TRH-GAL4* construct, we followed a procedure similar to that previously reported for construction of the *TH-GAL4* transgene (Friggi-Grelin et al., 2003a), using regulatory sequences from the *Drosophila melanogaster* *Trh* gene (CG9122). A 1.9 kb and a 3 kb genomic fragments, containing sequences located upstream and downstream the *Trh* transcription startsite, were cloned 5' and 3' to *GAL4* in pCaS-GAL4, in the *Stu* I and *Not* I sites, respectively (Figure S2). The following oligonucleotides were used: 5'-TTCCGTAGGCCTTGCCCTAAAGGTCCTGGGTCAA and 5'-AGCACTAGGCCTTGAC-TGCACTTGGTAGCTACT (sense and antisense for amplifying the 1.9 kb upstream segment); 5'-tagagcggccgcCAAgcaggaagtccctgcacc and 5'-GGAGgcgccgcca-ctctcgacagaattccggaag (sense and antisense for amplifying the 3 kb downstream segment). The restriction sites are underlined.

To generate the *VGlut-GAL4* construct, a 5.5 kb genomic fragment containing regulatory sequences from *Drosophila melanogaster* *VGlut* (CG9887) was fused upstream to *GAL4*. This fragment includes 3.6 kb upstream the *VGlut* transcription startsite and the 5'-untranslated coding sequence with the first two introns of the gene (Figure S3). Sequences were amplified from genomic DNA with the following oligonucleotides as sense and antisense primers, respectively: 5'-TAGGCCTTCTGCCCTGATCCTTGATGG and 5'-AAGGCCTTGCTCAGCTAGTAGTCCTGA. Synthetic restriction sites (underlined) allowed insertion at the *Stu* I site of pCaS-GAL4 (32). Plasmids were then screened for insertion in the correct orientation.

To construct *UAS-VGlut::GFP*, the *Drosophila VGlut* cDNA was first PCR amplified from the clone RH7445 of the Berkeley *Drosophila* Genome Project expressed sequence tag collection, with the following primers: sense, 5'- GCGAATTCGTGCGTTGTCCTGCTGAG, anti-sense, 5'- ACGAATTCCCTGCTGCTGGTATCCCTG. Synthetic EcoRI restriction sites are underlined. In the anti-sense primer, the *VGlut* TAA stop codon was replaced by GAA (in bold) to create an EcoRI site and allows in frame fusion with the *GFP* cDNA. The 2.5 kb *VGlut* fragment was then inserted in place of the *dEAAT1* fragment of *UAS-dEAAT1::GFP* (32) to obtain *UAS-VGlut::GFP*. This transgene encodes a fusion protein in which VGlut and GFP are separated by a linker of six glycine residues.

All constructs were checked by double-strand sequencing before injection. *Drosophila* germline transformation was performed by standard procedure using the plasmid pπ25.7wc as a source of transposase. Transgenic flies were generated in a *y, w* background. Several independent insertion strains were obtained for each transgene. Independent insertions of the *VGlut-GAL4* and *TRH-GAL4* drivers showed similar expression patterns when crossed to *UAS-GFP* reporter flies.

RNA extraction. Total RNA was extracted by the TRIzol (Invitrogen) method (33). Adult flies were anesthetized on ice and decapitated with a sterile scalpel. 20 heads (or 5 thoraxes) were dissolved in 500 µl TriZol and kept at -80°C overnight. Remaining tissues were then crushed with a mini-Potter. The mixture was extracted with 100 µl chloroform and centrifuged at 2,320 x g (5,000 rpm) in an Eppendorf 5415 R microcentrifuge for 10 min at 4°C. The supernatant was collected, mixed to 250 µl isopropanol, and stored for 30 min to 2 h at -20°C. After 15 min microcentrifugation at 2,320 x g, the pellet was washed twice with 250 µl 75% (vol/vol) ethanol prepared with diethylpyrocarbonate-treated water followed by 4 min microcentrifugation at 2,320 x g. The dried pellet was suspended in 20 µl RNase-free water. 1 µl of the solution was used to determine RNA concentration with a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific).

RT-PCR and qRT-PCR. For retrotranscription, 1 µg total RNA was mixed with 0.5 µg oligo(dT)₁₅ (Promega) and 10 mM dNTP mix (Promega) in RNase-free water. After heating at

65°C for 5 min, the tube was placed on ice and supplemented with 4 µl 5 x First-Strand Buffer (Invitrogen), 2 µl 0.1 M DTT and 1 µl RNAsin (Promega). After 2 min pre-incubation at 42°C, 1 µl SuperScript II Reverse Transcriptase was added and the reaction mix (final volume: 20 µl) was incubated for 50 min at 42°C. The reaction was stopped by heating at 70°C for 15 min. Semi-quantitative PCR was performed as previously described (34) in a Techne TC-312 thermal cycler in 20 µl final volume. The program included a cycle of 40 sec denaturation at 94°C, 40 sec annealing at 62°C and 40 sec elongation at 72°C, repeated 35 or 40 times.

For real-time PCR, RNA extracted from adult heads was cleaned from contaminant DNA prior to retrotranscription by treatment with RQ1 RNase-free DNase (Promega) according to the manufacturer's protocol. qPCR were carried out in a MyiQ2 two-color real-time PCR detection system (Bio-Rad) with the SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) in 96-well plates. Each well contained 2.5 µl of the retrotranscription product and 0.1 µM sense and antisense primers in 1 x Syber Green Mix, in a final volume of 25 µl. The ribosomal gene *rp49* was used as an internal control. The program was: 95°C denaturation for 10 min, followed by 40 amplification cycles (15 s at 95°C, 15 s at 55°C and 45 s at 60°C), and ended by 10-s ramping from 50°C to 90°C to run a melting curve. The following primers were used: for DAMB, sense: 5'- TTTGACTCCTCTGTCGCTCA, antisense: 5'-CAAAGAACGTAATGGAGGATG (amplicon: 232 nt); for *rp49*, sense: 5'- GACGCTTCAAGGGACAGTATC, antisense: 5'- AAACGCGGTTCTGCATGAG (amplicon: 126 nt).

Immunohistochemistry. Whole adult VNCs were dissected at room temperature in *Drosophila* Ringer's solution and fixed for 2 h on ice in a watch glass in 4% (wt/vol) paraformaldehyde in PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄) before being transferred with Dumont #5 forceps to 24-well plates (5-10 brains per well). After three 20-min washes in 0.5 ml PBS plus 0.5% (vol/vol) Triton X-100 (PBT), tissues were pre-incubated for 2 h in PBT + 2% (wt/vol) bovine serum albumin as blocking solution, transferred again to 96-well plates and incubated overnight at 4°C with agitation in the presence of primary antibodies diluted in blocking solution (final volume: 100 µl). The primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-TH (1:50; ImmunoStar), mouse anti-GFP (1:500; Invitrogen Molecular

Probes), rabbit anti-serotonin (1 :500; Sigma), rabbit anti-DAMB (1:100, (Han et al., 1996)) and rabbit anti-synaptotagmin (Syt-1) (1:100, generous gift of Hugo Bellen). After three 20-min washes in PBT, brains were incubated for 2 h at room temperature with 0.5 ml secondary antibodies: Alexa Fluor 555 anti-mouse, Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Invitrogen Molecular Probes), or FITC anti-rabbit, TRITC anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) diluted to 1:250. Tissues were washed three times again in PBT for 20 min and finally mounted in Vectashield (Vector Laboratories) or Mowiol 4-88 (Polysciences). Images were collected on a Nikon A1R confocal microscope and processed with ImageJ and Adobe Photoshop.

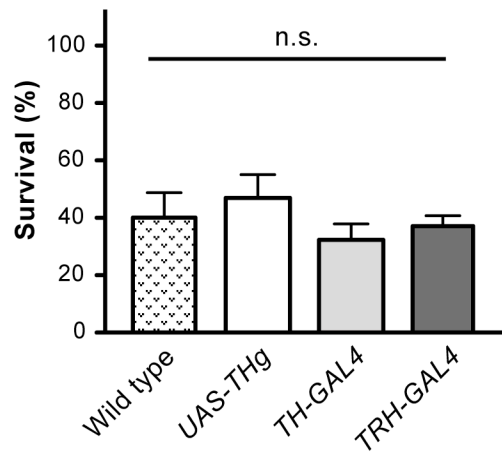


Fig. S1. Paraquat oxidative stress susceptibility of various *Drosophila* strains. Survival was monitored 2 h after application of 80 mM to the VNC of decapitated flies as described in Experimental procedures. Wild type (Canton S), *UAS-THg*, *TH-GAL4* and *TRH-GAL4* showed no difference in PQ vulnerability.

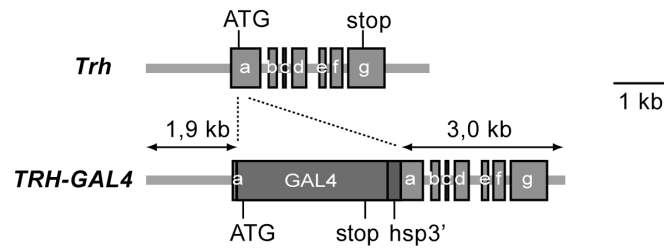
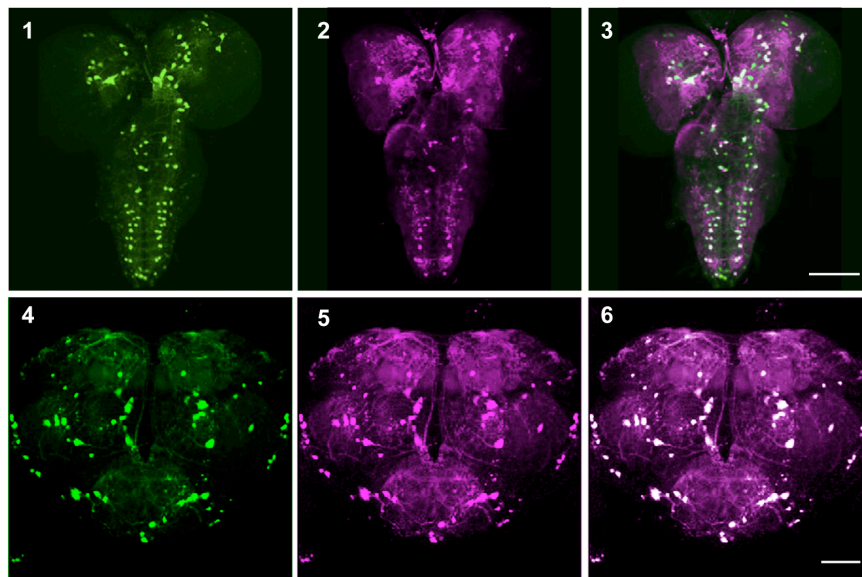
A**B**

Fig. S2. Structure and expression pattern of the serotonergic driver *TRH-GAL4*. **(A)** The *Drosophila Trh* gene that encodes the serotonin-synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase spans around 5.5 kb and includes 7 exons (a to g). Positions of the start (ATG) and termination (stop) translation codons are indicated. To generate *TRH-GAL4*, a segment containing the GAL4 gene fused to a transcription termination element from *hsp70* was inserted in exon a in place of the *Trh* ATG region. Scale bar: 1 kb. **(B)** Double staining of *TRH-GAL4; UAS-GFP-S65T*^{3rd} instar larval CNS (1-3) or adult brain (4-6) with anti-GFP and anti-serotonin antibodies. 1, 4: anti-GFP, 2,5: anti-serotonin, 3, 6: merge. In both larva and adults, overlapping of the two stainings is quite complete, indicating that the driver is specific for serotonergic neurons. Note the characteristic double row of serotonin neuron doublets in the larval VNC. Scale bars: 50 μ m.

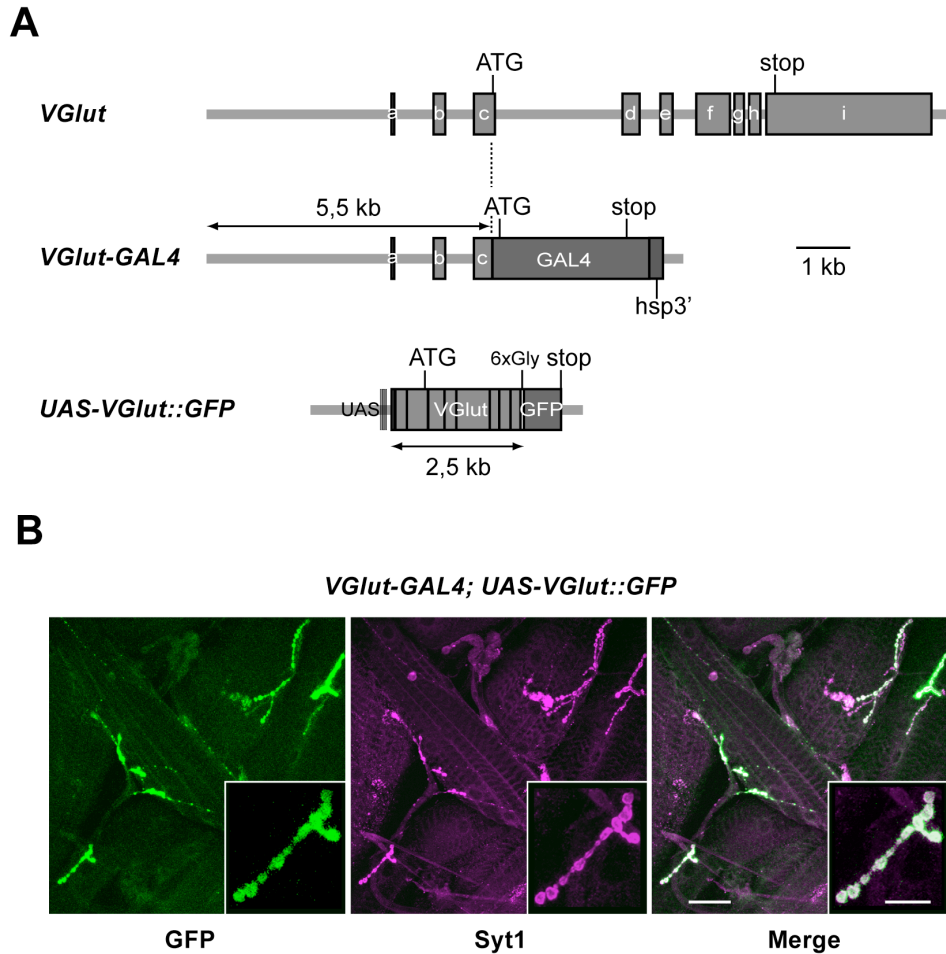


Fig. S3. Construction of the glutamatergic driver *VGlut-GAL4* and *UAS-VGlut::GFP* reporter. (A) The *Drosophila VGlut* gene that encodes the synaptic vesicle Glu transporter spans around 14.5 kb and includes 9 exons (a to i). To generate *VGlut-GAL4*, a 5.5 kb genomic segment just upstream the *VGlut* ATG was inserted 5' to the GAL4 gene fused to a transcription termination element from *hsp70*. To generate *UAS-VGlut::GFP*, a 2.5 kb cDNA fragment including the whole *VGlut* coding sequence was fused in frame upstream to the GFP sequence, under the control of GAL4-binding UAS (upstream activating sequences). In the encoded fusion protein, VGlut and GFP are separated by a 6-glycine spacer peptide (6xGly). Position of start (ATG) and termination (stop) translation codons are indicated in *VGlut* and in each derived construct. (B) Double staining on whole-mount body wall muscles of *VGlut-GAL4; UAS-VGlut::GFP* 3rd instar larva with anti-GFP (green) and anti-synaptotagmin (Syt-1,

a synaptic vesicle marker) antibodies. GFP and Syt-1 colocalize at the Glu neuromuscular junctions, confirming that *VGlut-GAL4* expresses in Glu motor neurons and that VGlut::GFP is addressed to Glu synaptic boutons as component of the synaptic vesicles. Scale bars: in panels, 40 μm ; in magnified inserts, 15 μm .

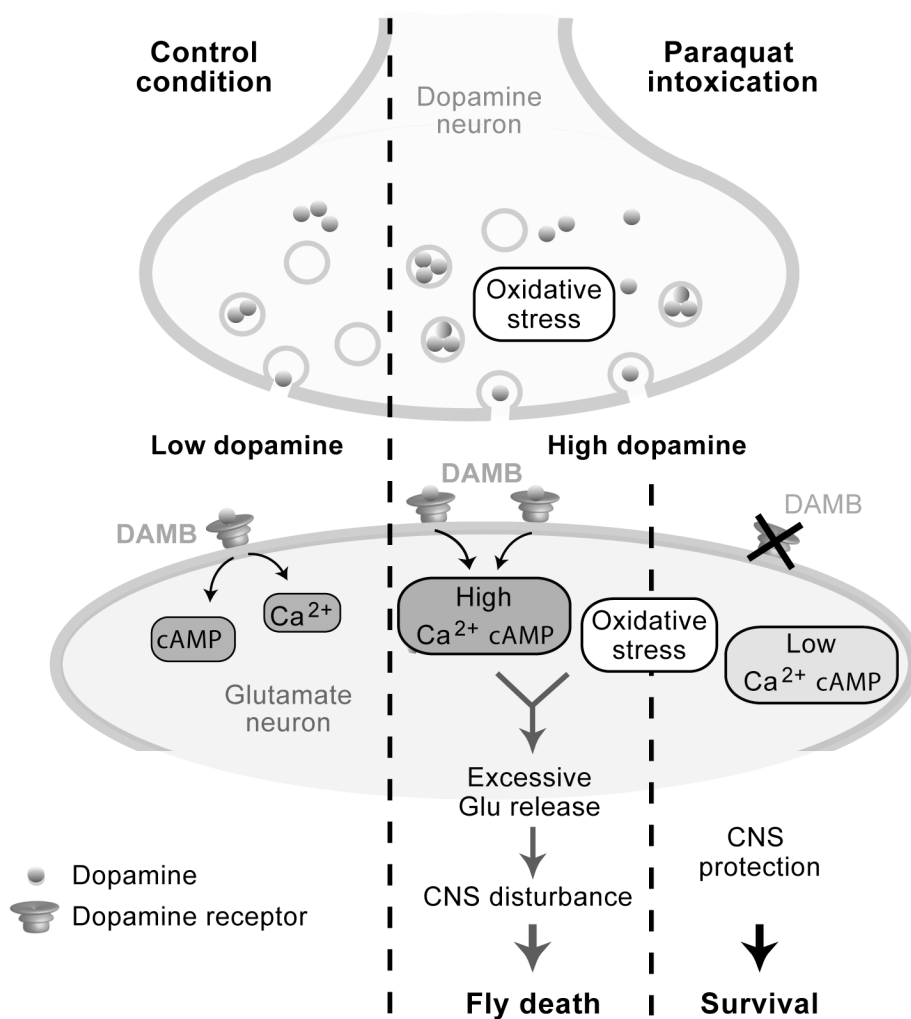


Fig. S4. Proposed mechanism of PQ toxicity in *Drosophila*. Extracellular DA released from PQ-challenged DA neurons overactivates the DA receptor DAMB in Glu neurons of the VNC. Glu neuron dysfunction would thus result from two synergetic causes: on the one hand, DAMB-mediated aberrant increase in intracellular Ca^{2+} and cAMP levels, and on the other hand, elevated OXS potentially caused by PQ itself and/or ROS produced by DA autoxidation. Excessive Glu release will ultimately lead to CNS failure by excitotoxicity and organism death.

Partie II : Travaux sur le modèle α -synucléine

Chapitre 1 : Neurotoxicité différentielle des formes sauvage et mutée de l' α -synucléine humaine exprimées dans les neurones de la drosophile

Riemensperger T., Cassar M., Coulom H., Iché-Torres M., Callens C. et Birman S.

Article en préparation

Résumé:

L' α -synucléine (α -syn) est une protéine qui joue un rôle central dans la pathogenèse des formes tardives les plus fréquentes de la maladie de Parkinson (MP), tant pour les cas familiaux que sporadiques. En effet, cette protéine s'accumule de façon anormale dans la MP et ses agrégats sont le composant majeur des corps de Lewy, une structure histologique caractéristique de la maladie. Trois mutations ponctuelles de l' α -syn (A30P, A53T et E46K), ainsi que la duplication ou la triplication du gène sauvage, sont associées à des formes familiales dominantes de la MP (Devine et al. 2011; Corti, Lesage, and Brice 2011). De plus, des études d'association pangénomiques ont montré qu'un polymorphisme localisé dans le promoteur du gène SNCA (qui code pour l' α -syn), qui induirait une surexpression du gène, est associé à de très nombreux cas cliniques de MP sporadique (Satake et al. 2009; Simón-Sánchez et al. 2009; Ding et al. 2011; Corti, Lesage, and Brice 2011).

Il y a une douzaine d'années paraissait dans la revue Nature le premier modèle génétique de la MP, développé chez la drosophile, par l'expression ectopique de l' α -syn humaine sauvage et mutée dans les neurones de drosophile (Feany and Bender 2000). Les auteurs rapportaient dans cet article que la surexpression de l' α -syn chez la drosophile récapitulait

les trois caractéristiques de la MP : perte de neurones dopaminergiques du cerveau, formation de corps de Lewy, et troubles locomoteurs d'évolution progressive. Les effets moteurs observés étaient plus sévères avec les formes mutées. Cependant, certains auteurs n'ont pas pu mettre en évidence des façons similaires des pertes des neurones dopaminergiques dans ce modèle (Pesah et al. 2005) (Coulom and Birman, unpublished), ce qui a mis en question la reproductibilité de ces résultats. Nous avons donc entrepris une étude approfondie des conséquences de la surexpression chez la drosophile de l' α -syn sauvage et mutée (forme A30P) sur le comportement des drosophiles et la physiologie des neurones dopaminergiques. Le résultat de ces travaux est rapporté dans les trois articles non publiés (chapitres 1-3) de cette deuxième partie.

La première étude rapportée dans ce chapitre a confirmé que l'expression pan-neuronale des formes sauvage et A30P de l' α -syn provoque une perte progressive des capacités locomotrices des drosophiles, évaluées comme Feany et Bender par un test de géotaxie négative. Leur expression dans les neurones dopaminergiques diminue la concentration de dopamine dans le cerveau, probablement dû à une inhibition de la biosynthèse de ce neurotransmetteur. Nous avons examiné les effets cellulaires de la surexpression de ces deux isoformes de synucléine et observé un grossissement des mitochondries, suggérant une augmentation de la fission mitochondriale et donc une augmentation du stress dans les neurones dopaminergiques, de même qu'un grossissement des varicosités axonales évoquant un défaut dans le trafic des vésicules synaptiques. Dans l'ensemble, les effets précédents étaient comparables pour les deux formes d' α -syn, même s'ils sont en général plus prononcés avec la forme mutée. Cependant, les formes sauvage et mutée se sont avérées avoir des effets contraires sur la résistance au stress oxydatif et l'initiation de l'apoptose dans les neurones dopaminergiques après traitement au paraquat (PQ). L' α -syn sauvage semble en effet protéger les drosophiles contre les effets nocifs du PQ, et en particulier l'activation de la caspase 3, une caspase initiateur de l'apoptose, dans les neurones dopaminergiques, alors que l' α -synA30P, au contraire, aggrave les effets du PQ en augmentant l'activation de la caspase3. Cela suggère que l' α -syn sauvage protégerait les

neurones contre le stress oxydatif alors que l' α -synA30P générerait à l'inverse plus de stress dans les neurones dopaminergiques, aggravant ainsi l'effet du PQ. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs sur les propriétés des formes sauvage et mutées de l' α -syn (C A da Costa, Ancolio, and Checler 2000; Sidhu, Wersinger, and Vernier 2004; Jin et al. 2011) mais n'avaient jamais été confirmés *in vivo*. Enfin, notre étude montre également que la spécificité de la neurotoxicité de l' α -synA30P vis-à-vis des neurones dopaminergiques serait liée à la présence de la dopamine elle-même. En effet, l'expression *in vivo* de la tyrosine hydroxylase dans les neurones sérotoninergiques confère à ces cellules la propriété de produire de la dopamine et les rend en même temps *de novo* sensible à la toxicité de l' α -synA30P.

— Dans cette étude, j'ai effectué les expériences de survie en présence de PQ, qui ont été le premier indice que les deux isoformes d' α -syn pouvaient parfois avoir des propriétés opposées. J'ai aussi effectué les RT-PCR et certains des immunomarquages.

Differential neurotoxicity of wild type and mutant forms of human α -synuclein expressed *in vivo* in *Drosophila* neurons

Riemensperger T^{1,2}, Cassar M^{1,2}, Coulom H², Iché-Torres M², Callens C¹. & Birman S^{1,2}

¹*Genetics and Physiopathology of Neurotransmission, CNRS, ESPCI ParisTech,, 10 rue Vauquelin, F-75233 Paris cedex 5, France.*

²*Genetics of Neurotransmission, IBDML-Developmental Biology Institute, CNRS, Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, Case 907, F-13288 Marseille cedex 9, France.*

Abstract:

Parkinson's disease (PD) is the most frequent neurodegenerative movement disorders in humans. Progressive degeneration of the dopaminergic nigrostriatal system leads to decline in movement control associated with tremor, rigidity and postural instability. One of the genes implicated in an inherited form of PD is human α -synuclein (α -syn), a cytosolic 140 aminoacid phosphoprotein of yet unknown function. Here, we studied the behavioral and cellular consequences of α -syn expression in *Drosophila* neurons. Pan-neuronal expression of either native α -synWT or its mutant pathogenic form α -synA30P triggered progressive locomotor impairments and strongly decreased brain dopamine levels. No noticeable loss of dopaminergic neurons was observed though these cells present striking abnormalities, such as swelling of mitochondria and of axonal varicosities. Further, we observed that pan-neuronal expression of α -synA30P but not native α -synWT induces a pro-apoptotic state in dopaminergic neurons and decreases *Drosophila* resistance to oxidative stress. Native α -synWT, in contrast, shows neuroprotective effects against both α -synA30P and oxidative stress in the *Drosophila* model. Ectopic dopamine synthesis in serotonergic neurons makes these cells susceptible to α -synA30P induced toxicity, triggering a prp-apoptotic state followed by gradual loss of these neurons. These results indicate, that dopamine itself causes the vulnerability of dopaminergic neurons to mutant α -synA30P *in vivo*

Introduction:

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by severe motor impairments, including uncontrollable tremor, postural instability, slowness of movement and rigidity. The progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) is the main histological hallmark of this disorder, resulting in a massive depletion of dopamine (DA) in the striatum, where the SN dopaminergic neurons project. Mutations in the SNCA gene that encodes the protein α -synuclein (α -syn) are associated with rare familial forms of PD. Native α -syn is a 140 amino acid protein of not yet well understood function. It is widely expressed in neuronal tissues and mainly localizes in nerve terminals. Naturally it occurs as a folded tetramer that binds to lipid membranes and does not aggregate (Bartels, Choi, and Selkoe 2011). However, under PD-like conditions, isolated α -syn monomers readily aggregate into amyloid-like fibrils forming round eosinophilic protein inclusions in cell somas, the so-called Lewy bodies (LB) (Spillantini et al. 1997; Tofaris and Spillantini 2005). Three point-mutations in α -syn have been associated with PD: A53T, E46K and A30P. Whereas α -synA53T shows a faster rate of LB-like filament formation compared to wild type α -syn (α -synWT) (Conway, Harper, and Lansbury 1998), the point mutation of α -synA30P seems to disrupt its interaction with lipid vesicles (Jensen et al. 1998). In sporadic as in genetic cases of PD, nigrostriatal cells seem to be under elevated state of oxidative stress, as indicated by by-products of lipid, protein and DNA oxidation in patient brain tissues (Dexter et al. 1989; Jenner 2003). Kinetic simulations predict that oxidative stress synergistically enhances α -syn aggregation in the sporadic and genetic forms of PD (Raichur, Vali, and Gorin 2006).

In recent years *Drosophila* was extensively shown to be an adequate model to study the mechanisms of human pathogenesis. The first attempt to mimic genetically Parkinson's disease in an animal model was carried out by pan-neuronal expression of human α -syn or its mutated A30P and A53T forms in *Drosophila*. This caused age dependent locomotion defects and gradual loss of ~50% or more of cells in a dorsomedial cluster of the brain

dopaminergic system (Feany and Bender 2000; Auluck et al. 2002; Yang et al. 2003; L. Chen and Feany 2005). In further studies, much variable losses of dopaminergic neurons were reported upon expression of α -syn or its mutant forms in *Drosophila* neurons, going from loss of 2 or 3 cells in a select cluster to major neurodegeneration in many cell clusters (Cooper et al. 2006; Outeiro et al. 2009; Trinh et al. 2008; Trinh et al. 2010; Botella, Bayersdorfer, and Schneuwly 2008; Bayersdorfer et al. 2010) while some authors did not detect any loss of dopaminergic neurons in strictly similar conditions in this model (Auluck, Meulener, and Bonini 2005; Pesah et al. 2005).

Here we expressed either α -synWT or α -syn30P or both *in vivo* in *Drosophila* neurons to compare the effects of ectopic expression of these proteins on behavior, neuronal dysfunction and oxidative stress resistance. Although we did not detect neuronal loss in our conditions, we provide several lines of evidence that expression of both α -syn isoforms in *Drosophila* induces dysfunction of dopaminergic neurons. Either α -synWT or α -syn30P trigger swelling of mitochondria and bulging of nerve terminal varicosities in dopaminergic neurons, and significantly decrease dopamine content in brain. However, we found that accumulation of α -synWT or α -syn30P had opposite effects on resistance to oxidative stress. Survival of *Drosophila* in the presence of paraquat (PQ), an oxidative stressor, was significantly prolonged or, respectively shortened when α -synWT or α -syn30P were expressed in dopaminergic neurons. Furthermore, pan-neuronal expression of α -synA30P in *Drosophila* aggravated PQ-induced oxidative stress selectively in dopaminergic neurons, as revealed by increased proteolytic activation of caspase-3 (casp-3), an effector of apoptotic cell death in PD (Hartmann et al, PNAS 2000). In contrast, pan-neuronal expression of α -synWT prevented casp-3 activation in the presence of PQ. This suggests that α -synWT can protect fly dopaminergic neurons against oxidative stress and that α -syn30P has, on the opposite, an aggravating effect. Under normal conditions serotonergic neurons seem not to be affected by the presence of α -synA30P. We show here that ectopic expression of *Drosophila* tyrosine hydroxylase (DTH), the dopamine-biosynthesising enzyme, in

serotonergic neurons, makes these cells susceptible to α -synA30P toxicity, potentially explaining in part selective vulnerability of dopaminergic neurons to this pathogenic protein.

Materials and Methods

Drosophila culture and strains. The following *Drosophila* strains were used: *elav-GAL4*, a pan-neuronal driver (Lin and Goodman, Neuron 1994); *TH-Gal4*, *TRH-Gal4* and *Ddc-Gal4*, that express in dopaminergic neurons, serotonergic neurons, or both, respectively; *UAS-GFP-S65T*; *UAS-DTHg.4* (Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003); *UAS-DVGlut::GFP* used as a synaptic vesicle marker; *UAS- α -synWT* and *α -synA30P* (Feany and Bender 2000). The *UAS-a-synWT*; *UAS-a-synA30P* strain was generated by meiotic recombination.

Immunohistochemistry. According to the experiments, the secondary antibodies were goat anti-mouse, anti-rabbit or anti-rat IgG conjugated to Alexa Fluor 488 or 555 (Invitrogen Molecular Probes, 1:500). For TH (Immunostar, 1:50), serotonin (Sigma, 1:500), human α -synuclein (Sigma, 1:500), activated caspase-3 (Cell Signaling, 1.5:250), Elav (Developmental Study Hybridoma Bank, 1:30) and GFP (Abcam, 1:500) immunostainings, brains were dissected in *Drosophila* Ringer's solution (130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.35 mM KH₂PO₄, pH 7.5), fixed for 2 h on ice in 4% paraformaldehyde in PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄), followed by three 20-min washes in PBS. After 2 h pre-incubation in PBS containing 0.5% Triton X-100 (PBT) plus 2% BSA, brains were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in the same solution. This was followed by: three 20-min washes in PBT, 2 h incubation with the secondary antibodies at room temperature, three 20-min washes in PBT. Brains were finally washed in PBS for two days at 4°C to reduce background. Tissues were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Confocal microscopy was performed with a Zeiss (Oberkochen, Germany) LSM 510 microscope.

Negative geotaxis. Startle-induced negative geotaxis was assayed as previously described (2). Groups of 10 to 20 flies were placed in a vertical column (25 cm long, 1.5 cm

diameter) with a conic bottom end. They were suddenly startled by gently tapping them down, to which *Drosophila* respond by climbing up. After 1 min, flies having reached the top of the column (above 20.5 cm) and flies remaining at the bottom end (below 6.5 cm) were separately counted. Three trials were performed at 1 min intervals. The scores are the mean of the numbers of flies at the top (n_{top}) and at the bottom (n_{bot}), expressed as percentages of the total number of flies (n_{tot}). Results are the mean \pm SEM of the scores obtained in three independent experiments. The performance index (PI) is defined as $1/2((n_{tot} + n_{top} - n_{bot})/n_{tot})$. To test for the effect of aging on negative geotaxis, thirty flies of each condition were evaluated each week throughout a period of eight weeks. Dead flies were replaced by substitutes of the same age. Statistical analysis was performed on the PIs with the Student's t test.

DA quantification via HPLC. Brains of 30 day old flies were dissected in *Drosophila* Ringer's solution and transferred into ice cold 50 mM citric acid solution and filtered. The DA and 5-HT levels of the brain extracts were determined by HPLC coupled to electrochemical detection essentially using a mobile phase containing 4 mM decanesulfonic acid, 50 mM citrate/acetate, pH 4.5, 20% acetonitrile. Standard detection of DA was performed at a detector potential of +500 mV relative to an Ag/AgCl electrode.

RT-PCR. For retrotranscription, 1 μ g total RNA was mixed with 0.5 μ g oligo(dT)₁₅ (Promega) and 10 mM dNTP mix (Promega) in RNase-free water. After heating at 65°C for 5 min, the tube was placed on ice and supplemented with 4 μ l 5 x First-Strand Buffer (Invitrogen), 2 μ l 0.1 M DTT and 1 μ l RNasin (Promega). After 2 min pre-incubation at 42°C, 1 μ l SuperScript II Reverse Transcriptase was added and the reaction mix (final volume: 20 μ l) was incubated for 50 min at 42°C. The reaction was stopped by heating at 70°C for 15 min. Semi-quantitative PCR was performed as previously described (Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003) in a Techne TC-312 thermal cycler in 20 μ l final volume. The program included a cycle of 40 sec denaturation at 94°C, 40 sec annealing at 62°C and 40 sec elongation at 72°C, repeated 35 or 40 times.

Paraquat ingestion. PQ treatment was performed on 7 to 10-day old adult females by dietary ingestion of the drug. 10 flies were incubated at 25°C in a 2-inch (5.2 cm) diameter Petri dish containing two layers of Whatman paper soaked with 600 µl PQ (methyl viologen, Sigma) diluted in 2% (wt/vol) sucrose or sucrose only for controls. To avoid dehydration, dishes were enclosed in a plastic box layered with moist paper. 9 or 10 Petri dishes were independently tested for each condition. Survival was monitored after 24 or 48 h. We generally used 20 mM PQ in ingestion experiments, which yielded ~40% survivors after 24 h for wild type flies (Cassar et al., under submission).

Results

Subcellular localization of human α -syn and α -synA30P in *Drosophila* neurons

We first compared the subcellular localization of human α -synWT and α -synA30P isoforms in brains of aged (50-day old) *Drosophila*, when expressed in all neurons with *elav*-Gal4 (Fig. 1). Antibody staining revealed that α -synWT localized in most neuropilar projections and pre-synaptic regions (Fig. 1B5, 6). Neuropils of the mushroom bodies, antennal lobes, lobula and medulla are clearly labelled. This pattern is comparable to that of presynaptic proteins, such as the active zone marker Bruchpilot (Fig.1A) . The pattern of α -synA30P showed a different appearance with reduced staining in synaptic structures and primary localization in the cell bodies (Fig. 1B8, 9), comparable to the pattern of pan-neuronally expressed cytosolic GFP (Fig. 1A2). Any neuropil other than the mushroom bodies showed a low level of anti- α -syn signal in *elav*> α -synA30P brain. This difference can be easily seen in the antennal lobes: in this structure, α -synWT mainly localized within the synaptic densities of the glomeruli (Fig. 1B5, 6, AL), whereas α -synA30P mainly localized in the somata of the olfactory projection neurons (Fig. 1B8, 9, AL, *arrows*).

α -synWT and α -synA30P do not trigger loss of dopaminergic neurons but decrease brain dopamine content

In order to estimate degeneration of dopaminergic neurons over time, we used antibody staining against TH in whole-mount brains. We quantified cell numbers of all TH-positive cell clusters (Fig. 2A), except the PAM cluster because cells of this cluster are very exposed and for this reason vulnerable to lesions caused by the preparation. Comparison between the dopaminergic systems of flies in their first week after eclosion and flies in their eighth week (60 days) after eclosion revealed no ostentatious degeneration in any of the dopaminergic cell clusters (Fig. 2B), either in control flies or in flies expressing α -synWT or α -synA30P in all neurons. However, we observed that pan-neuronal over-expression of either form of α -syn accelerated the progressive locomotor impairments caused by aging in flies, as monitored by startle-induced negative geotaxis. Because dopamine is required for proper performance in this behavior (Riemensperger et al. 2011), we measured dopamine levels in brains of flies expressing α -synWT or A30P in dopaminergic neurons with the *TH-Gal4* driver (Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003). Dopamine determination was performed by HPLC (Hardie and Hirsh, J Neurosci Meth 2006) on 35-day old flies because α -syn-induced locomotor deficits start to aggravate significantly compared to control flies after the fourth week of adulthood. The accumulation of either α -synWT or α -synA30P in dopaminergic neurons reduced brain dopamine level by ~35 and 60%, respectively (Fig 1D, E).

α -synWT and α -synA30P cause bulging of dopaminergic neuron varicosities

In vertebrates α -syn was originally identified in a screen for synaptic vesicle-associated proteins (Maroteaux, Campanelli, and Scheller 1988) and this protein is known to interact with lipid membranes and induce vesicle trafficking defects when it accumulates in nerve terminals (Auluck et al, Annu Rev Cell Dev Biol 2010). To visualize synaptic vesicles in dopaminergic neurons of α -syn-expressing *Drosophila*, we co-expressed α -syn isoforms and a GFP-tagged vesicular glutamate transporter (DvGlut) with *TH-Gal4*. We examined PPL2 dopaminergic neurons whose axonal tracts cross the lobula towards the medulla, as these neurons are prominent and rather easy to identify (Fig. 3). Varicosities (i.e. dopaminergic

terminals) are regularly spaced along the axons of these neurons and they accumulate synaptic vesicles, as revealed by the DVGlut::GFP marker (Fig. 3A). We found that varicosity size increased significantly in the presence of α -syn (Fig. 3B, C), when compared to control flies (Fig. 3A): larger diameter was up to two-fold higher with α -synWT and up to three-fold higher with α -synA30P (Fig. 3E). This effect is likely caused by synaptic vesicle accumulation in the terminals because the enlarged varicosities show a strong DVGlut::GFP signal.

α -synWT and α -synA30P promote mitochondrial fusion in dopaminergic neurons

Mitochondrial dysfunction has long been suspected to be implicated in Parkinson's disease pathogenesis and recent advances on genetics of the disease appear to fully confirm this view (Schapira and Gegg 2011; Corti, Lesage, and Brice 2011; Exner et al. 2012). It has been reported that α -syn interacts directly with mitochondrial membranes (Nakamura et al. 2008). We expressed mito-GFP in dopaminergic neurons to analyze the appearance of somatic mitochondria in presence or absence of either form of α -syn. Confocal microscopy analysis of mitochondrial complexes in dopaminergic neurons of 10-day old flies revealed a variable size of mitochondrial complexes, ranging from 0,5 to 2 μ m on their largest extension (Fig. 4A,1-3). In the presence of either α -synWT or α synA30P, we observed an increase of mitochondrial complexes up to 3 μ m on their largest extend (Fig. 4A, 4-9) and ~1.4-fold as a mean (Fig. 4B). The increase in size of somatic mitochondrial complexes caused by either form of α -syn despite their differential localization in the cell (see Fig. 1B) suggests that α syn has an indirect effect on the mitochondrial fission/fusion process.

As similar mitochondria phenotypes were observed in *Pink1* mutant flies (Yang et al, PNAS 2008) and because Pink1 acts downstream of parkin, we were interested in regulation of these two PD- and mitochondria-associated genes in α -syn-expressing flies. Semi-quantitative RT-PCR analysis of flies expressing α -synWT or α -synA30P in all neurons show a reduction of both parkin and Pink1 transcripts, when compared to the wild-type control (Fig. 4C). Co-expression of both α -synWT and α -synA30P appeared to, inhibit *Pink1* and *parkin*

expression nearly completely, suggesting that the two forms of α -syn have a synergistic effect on the expression of these two genes.

Opposite effects of α -synWT and α -synA30P on *Drosophila* survival under oxidative stress

Because mitochondrial dysfunction can both generate and result from oxidative stress (Lin and Beal, Nature 2006), we tested the paraquat (PQ) resistance of α -syn-expressing flies. PQ is a toxin used as an herbicide that readily generates free radicals in cells and was identified as a risk factor in PD (Tanner et al. 2011). Exposure of *Drosophila* to oxidative stressors such as rotenone or PQ induce locomotion defects and selective dopaminergic neuron loss (Coulom and Birman 2004; Chaudhuri et al. 2007; Lawal et al. 2010). Feeding 20 mM PQ for 24h to 1-week old control flies resulted in a survival rate of $38.2 \pm 5.8\%$ (SEM) of the population. Interestingly, expression of α -synWT in all neurons protected the flies temporally against oxidative stress, such that $71,6 \pm 4,0\%$ survived PQ exposure after 24 h, whereas α -synA30P-expressing flies were far more susceptible than controls as only $23.0 \pm 5.7\%$ survived (Fig. 5A)., Flies co-expressing both forms of α -syn were surprisingly as much protected, ($76,2 \pm 2,5\%$ of survivors) as with α -synWT alone. We then used two different Gal4 lines to drive α -syn expression in the dopaminergic system: *TH-Gal4* that only expresses in dopaminergic neurons in brain, and *Ddc-Gal4* that targets dopaminergic and serotonergic neurons. Both drivers were able to protect flies against PQ when they expressed α -synWT, but only *TH-Gal4* and not *Ddc-GAL4* aggravated PQ effects on survival when these drivers were used to express α -synA30P (Fig. 5B).

Opposite effects of α -synWT and α -synA30P on pro-apoptosis induced by oxidative stress in dopaminergic neurons

Oxidative stress can trigger neuronal apoptosis in PD (Hartmann et al, PNAS 2000; Mattson, Antioxid Redox Signal 2006). We found, that control flies (not expressing α -syn) exposed for 24 h to PQ showed activation of the pro-apoptotic casp-3 in DA cell-clusters, as revealed with a specific antibody (Fig. 5C4-6) and by comparison to controls not exposed to PQ (Fig. 5C1-3). In the presence α -synA30P expressed in all neurons, activated casp-3-positive cells

were found in nearly all brain dopaminergic clusters examined and selectively in these cells (Fig. 5C7-9), suggesting an aggravating effect. In contrast, flies expressing α -synWT did not show any casp-3 activation in DA neurons under PQ (Fig. 5C7-9), giving an immunostaining similar to control flies not treated with PQ. This result therefore reinforces the conclusion that α -synWT protects against oxidative stress in dopaminergic neurons.

Dopamine is required for α -synA30P-induced neuronal pro-apoptosis

Serotonergic neurons contain all proteins required to produce dopamine, like dopa decarboxylase (Ddc), except the TH enzyme. We used a specific serotonergic driver, TRH-Gal4, to express TH in these cells *in vivo* in *Drosophila* (Fig. 6A). This gave to serotonergic neurons the capacity to produce dopamine, as demonstrated by a significantly elevated dopamine level in brain compared to wild type flies (Fig. 6B). We observed casp-3 activation when α -synA30P was expressed in dopaminergic neurons (Fig. 6C1-3), even in the absence of PQ, but not in serotonergic neurons (Fig. 6C1-3), suggesting that these cells are normally resistant to the pathogenic protein. In contrast, dopamine-producing serotonergic neurons became susceptible to α -synA30P, as shown by the activation of casp-3 in these cells (Fig. 6C7-9). This shows that α -synA30P requires the presence of dopamine to induce oxidative stress and pro-apoptosis in neurons.

Discussion:

En cours d'écriture: voir discussion de la thèse.

References:

- Auluck, P. K., Chan, H. Y. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., & Bonini, N. M. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), 865–8. doi:10.1126/science.1067389
- Auluck, P. K., Meulener, M. C., & Bonini, N. M. (2005). Mechanisms of Suppression of {alpha}-Synuclein Neurotoxicity by Geldanamycin in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), 2873–8. doi:10.1074/jbc.M412106200

- Bartels, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, *477*(7362), 107–10. doi:10.1038/nature10324
- Bayersdorfer, F., Voigt, A., Schneuwly, S., & Botella, J. a. (2010). Dopamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* models of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *40*(1), 113–9. doi:10.1016/j.nbd.2010.02.012
- Botella, J. A., Bayersdorfer, F., & Schneuwly, S. (2008). Superoxide dismutase overexpression protects dopaminergic neurons in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *30*(1), 65–73. doi:10.1016/j.nbd.2007.11.013
- Chaudhuri, A., Bowling, K., Funderburk, C., Lawal, H., Inamdar, A., Wang, Z., & O'Donnell, J. M. (2007). Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(10), 2457–67. doi:10.1523/JNEUROSCI.4239-06.2007
- Chen, L., & Feany, M. B. (2005). Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nature neuroscience*, *8*(5), 657–63. doi:10.1038/nn1443
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine*, *4*(11), 1318–20. doi:10.1038/3311
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science (New York, N.Y.)*, *313*(5785), 324–8. doi:10.1126/science.1129462
- Corti, O., Lesage, S., & Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological reviews*, *91*(4), 1161–218. doi:10.1152/physrev.00022.2010
- Coulom, H., & Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(48), 10993–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004
- Dexter, D. T., Wells, F. R., Lees, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, *52*(6), 1830–6.
- Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., & Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*, *31*(14), 3038–62. doi:10.1038/emboj.2012.170
- Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease, *404*(March).
- Friggi-Grelin, F., Iché, M., & Birman, S. (2003). Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *35*(4), 260–9. doi:10.1002/gene.1082

- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 53 Suppl 3, S26–36; discussion S36–8. doi:10.1002/ana.10483
- Jensen, P. H., Nielsen, M. S., Jakes, R., Dotti, C. G., & Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *The Journal of biological chemistry*, 273(41), 26292–4.
- Lawal, H. O., Chang, H.-Y., Terrell, A. N., Brooks, E. S., Pulido, D., Simon, A. F., & Krantz, D. E. (2010). The Drosophila vesicular monoamine transporter reduces pesticide-induced loss of dopaminergic neurons. *Neurobiology of disease*, 40(1), 102–12. doi:10.1016/j.nbd.2010.05.008
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(8), 2804–15.
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Wallender, E. K., Kaehlcke, K., Ott, M., & Edwards, R. H. (2008). Optical reporters for the conformation of alpha-synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(47), 12305–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.3088-08.2008
- Outeiro, T. F., Klucken, J., Bercury, K., Tetzlaff, J., Putcha, P., Oliveira, L. M. A., Quintas, A., et al. (2009). Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *PloS one*, 4(9), e6906. doi:10.1371/journal.pone.0006906
- Pesah, Y., Burgess, H., Middlebrooks, B., Ronningen, K., Prosser, J., Tirunagaru, V., Zysk, J., et al. (2005). Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in Drosophila. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 41(4), 154–9. doi:10.1002/gene.20106
- Raichur, A., Vali, S., & Gorin, F. (2006). Dynamic modeling of alpha-synuclein aggregation for the sporadic and genetic forms of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 142(3), 859–70. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.06.052
- Schapira, A. H. V., & Gegg, M. (2011). Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinson's disease*, 2011, 159160. doi:10.4061/2011/159160
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–40. doi:10.1038/42166
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 119(6), 866–72. doi:10.1289/ehp.1002839
- Tofaris, G. K., & Spillantini, M. G. (2005). Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 20 Suppl 1, S37–44. doi:10.1002/mds.20538
- Trinh, K., Andrews, L., Krause, J., Hanak, T., Lee, D., Gelb, M., & Pallanck, L. (2010). Decaffeinated coffee and nicotine-free tobacco provide neuroprotection in Drosophila models of Parkinson's disease through an NRF2-dependent mechanism. *The Journal of*

neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 30(16), 5525–32.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4777-09.2010

Trinh, K., Moore, K., Wes, P. D., Muchowski, P. J., Dey, J., Andrews, L., & Pallanck, L. J. (2008). Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(2), 465–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.4778-07.2008

Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., & Lu, B. (2003). Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron*, 37(6), 911–24.

Figures

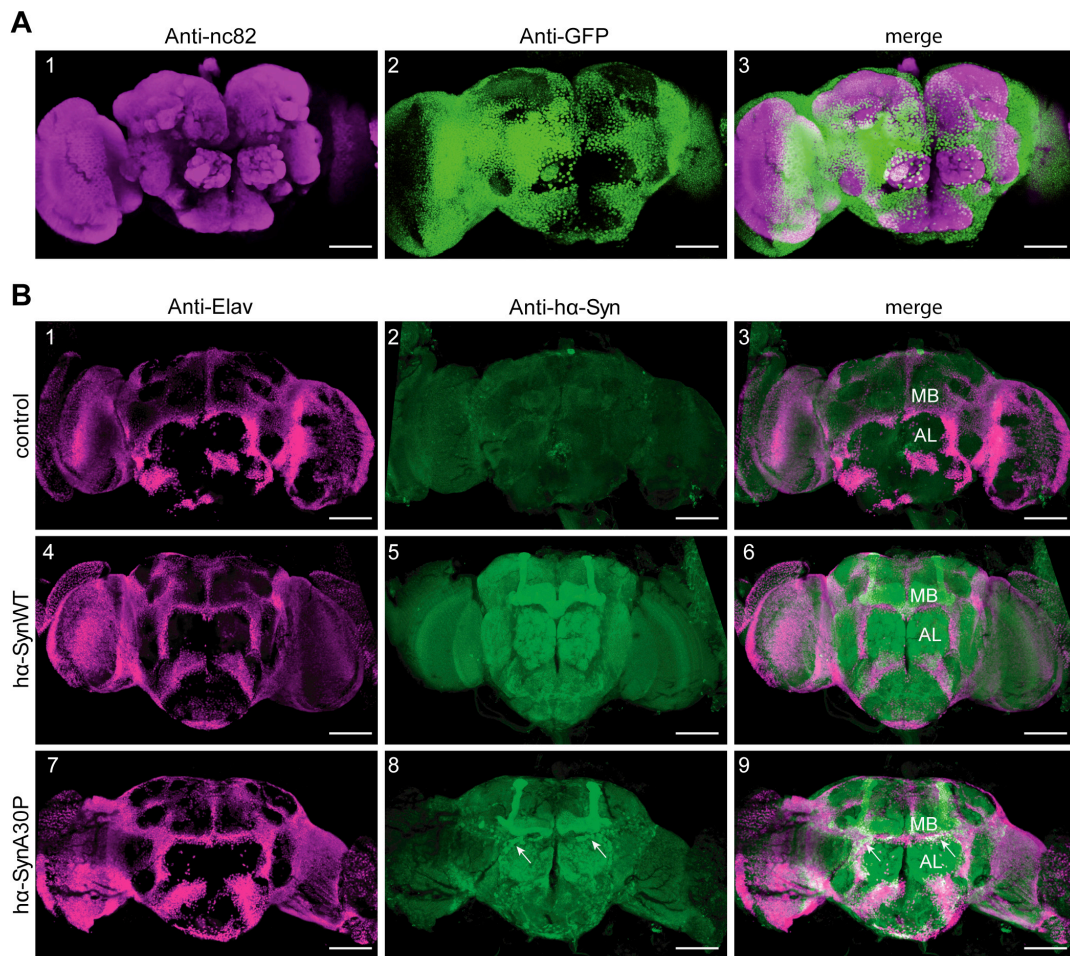


Fig 1 : Differential subcellular localization of human α -synWT and α -synA30P in *Drosophila* brain neurons. A. Pattern of *elav-Gal4*-driven cytosolic GFP in brain. 1: visualization of the CNS neuropil with the nc82 antibody directed against the presynaptic active zone protein Bruchpilot. 2: immunostaining with anti-GFP. 3: merge of stainings in 1 and 2. Cytosolic GFP is mainly restricted to cortical regions containing neuronal somata, since it does not diffuse far inside axonal projections. **B.** Patterns of *elav-Gal4*-driven α -synWT and α -synA30P in brains of 50-day old *Drosophila*. 1, 4, 7: anti-elav. 2, 5, 8: anti- α -syn. 3, 6, 9: merge. No signal can be detected in the brain of control wild type flies (2). Pan-neuronally expressed α -synWT is detected in the whole neuropil (5, compare to A1), whereas the expression of α -synA30P appears more pronounced in the somata of neurons

than in their projections (8, 9, arrows). AL: antennal lobes, MB: mushroom bodies. Scale bar:
100 μm .

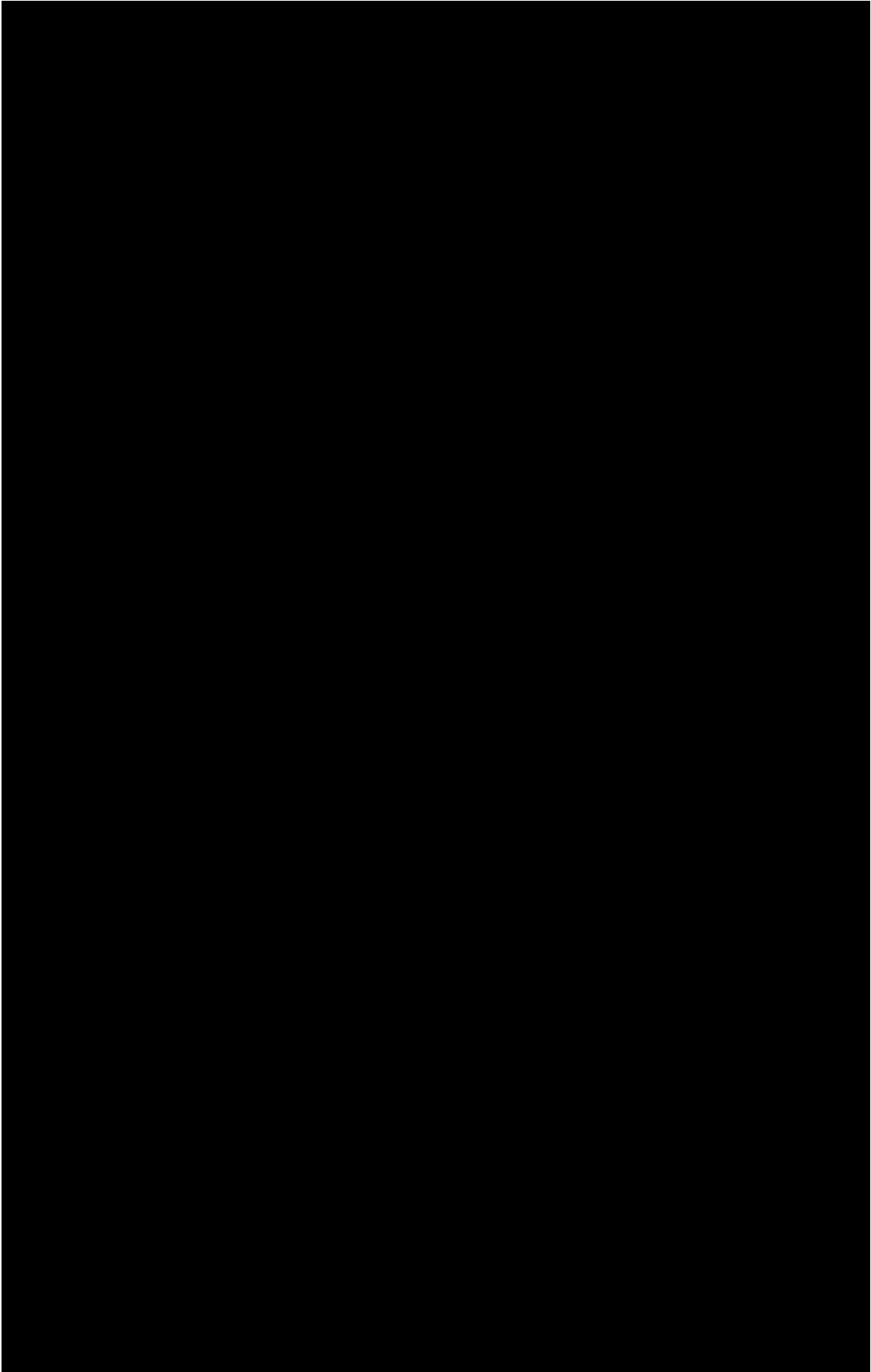


Fig. 2 : Neuronal expression of α -synWT and α -synA30P does not trigger dopaminergic cell loss but decreases brain dopamine content. **A.** Schematic depiction of the dopaminergic system of the *Drosophila* adult brain. Nomenclature according to (Nässel and Elekes, 1992). PAM: protocerebral anterior medial, PAL: protocerebral anterior lateral, PPL: protocerebral posterior lateral, PPM: protocerebral posterior medial. Me: Medulla, Mb: mushroom bodies, SEG: subesophageal ganglion. **B.** Quantification of dopaminergic neuron clusters labeled by TH immunostaining on whole-mount brains did not reveal any α -syn-related decrease in cell number between the first and 60th day after eclosion. **C.** Age-dependent progressive locomotion decline is accelerated in *Drosophila* expressing α -synWT and α -synA30P in all neurons, as reported by (Feany and Bender, 2000). **D.** HPLC assay of dopamine contents in brains of 4-week old flies expressing α -synWT or α -synA30P specifically in dopaminergic neurons with *TH-GAL4*. HPLC -measurement was standardized relative to the level of dopamine in control flies of the same age. Expression of either isoforms significantly reduced the level of dopamine. The effect was stronger with α -synA30P than α -synWT ($p < 0,01$, students t-test). **E.** Example of HPLC traces showing the reduction of dopamine content in flies expressing α -synWT or α -synA30P compared to control flies.

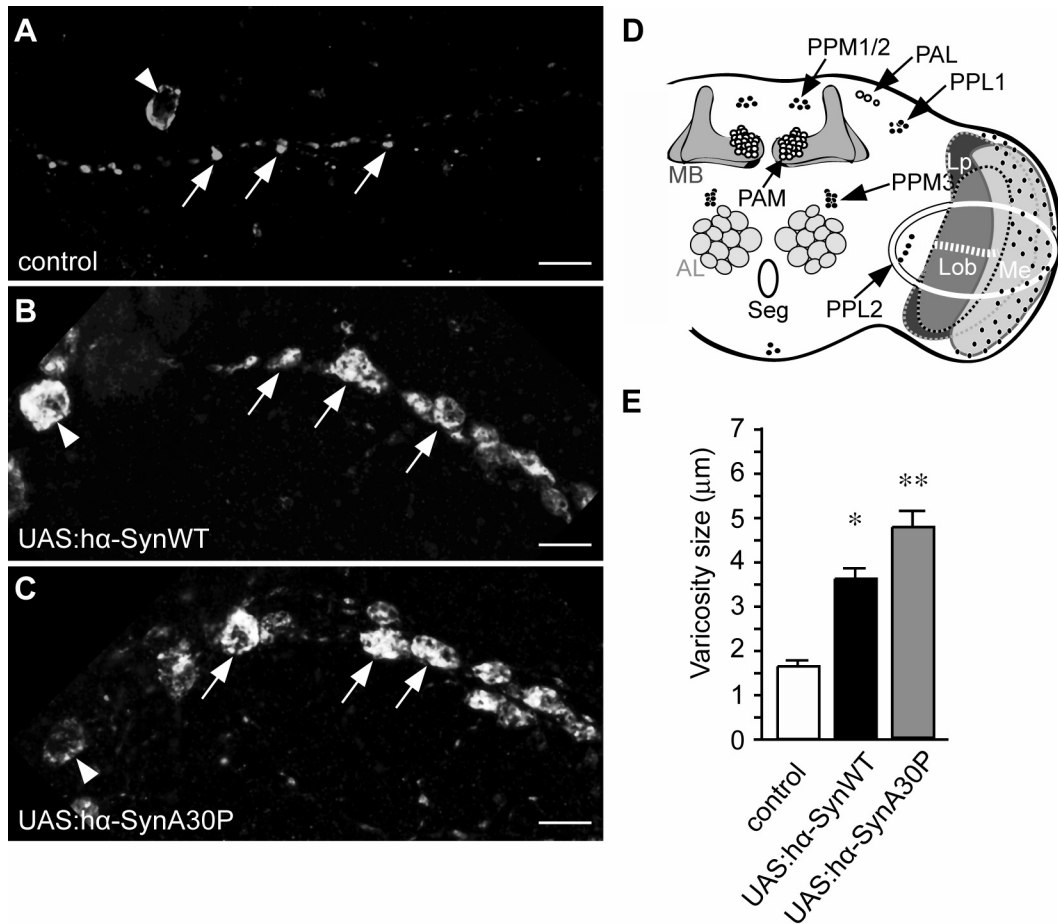


Fig. 3: α -syn expression causes bulging of dopaminergic neuron varicosities: A-C. Visualization of synaptic vesicle-containing varicosities along the axonal tract of a PPL2 dopaminergic neuron. Control flies (*TH-GAL4, UAS-DVGlut::GFP*) (**A**) showed varicosities (*arrows*) of 1-2 μm in diameter, whereas flies expressing α -synWT (**B**) or α -synA30P (**C**) in dopaminergic neurons show a strong increase in size of these structures, up to 5 μm in diameter. The cell body of the neuron is also visible (*arrowhead*). **D.** Schematic depiction of a fly brain showing localization of the axonal tract of the dopaminergic neuron examined in **A-C** that crosses the optic lobe (*white circle*). **E.** Quantification of dopaminergic varicosity sizes in the different genotypes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA). Scale bar: 5 μm .

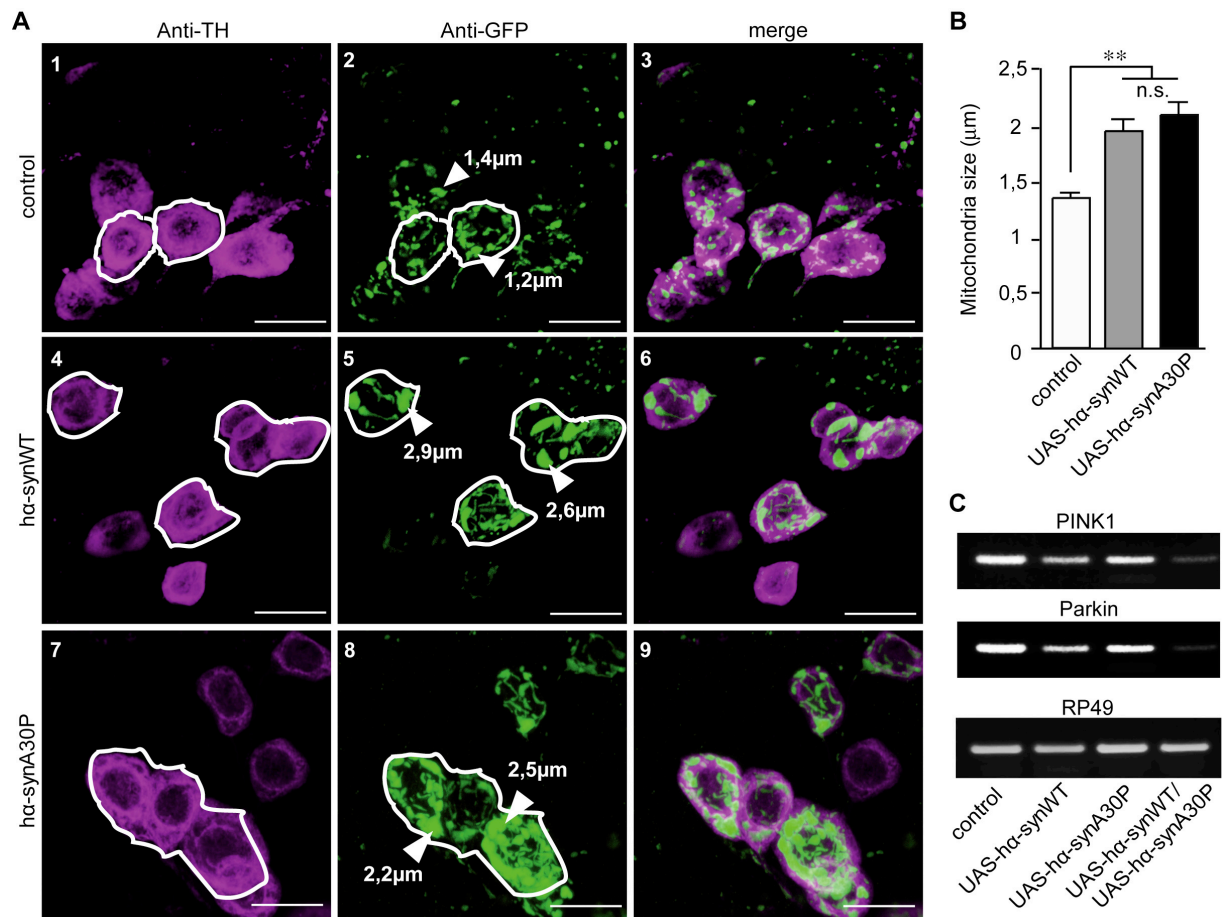


Fig. 4: Expression of α -syn alters the size of mitochondria in dopaminergic neurons.

A. Expression of α -synWT (5) or α -synA30P (8) in dopaminergic neurons (anti-TH, magenta) with *TH-Gal4* increases the size of mitochondria (*arrowheads*) in comparison to controls (2), as visualized with the mitochondrial marker mito-GFP (anti-GFP, green). **B.** Quantification of the largest diameter of mitochondria observed in dopaminergic neurons (** $p < 0.01$, ANOVA). **C.** RT-PCR analysis of the genes parkin and PINK1 in brains of flies expressing α -synWT or α -synA30P in all neurons with *elav-Gal4*. Expression of the two mitochondria-associated genes appears down-regulated in α -syn-expressing flies. A stronger effect is observed when α -synWT and α -synA30P are co-expressed.

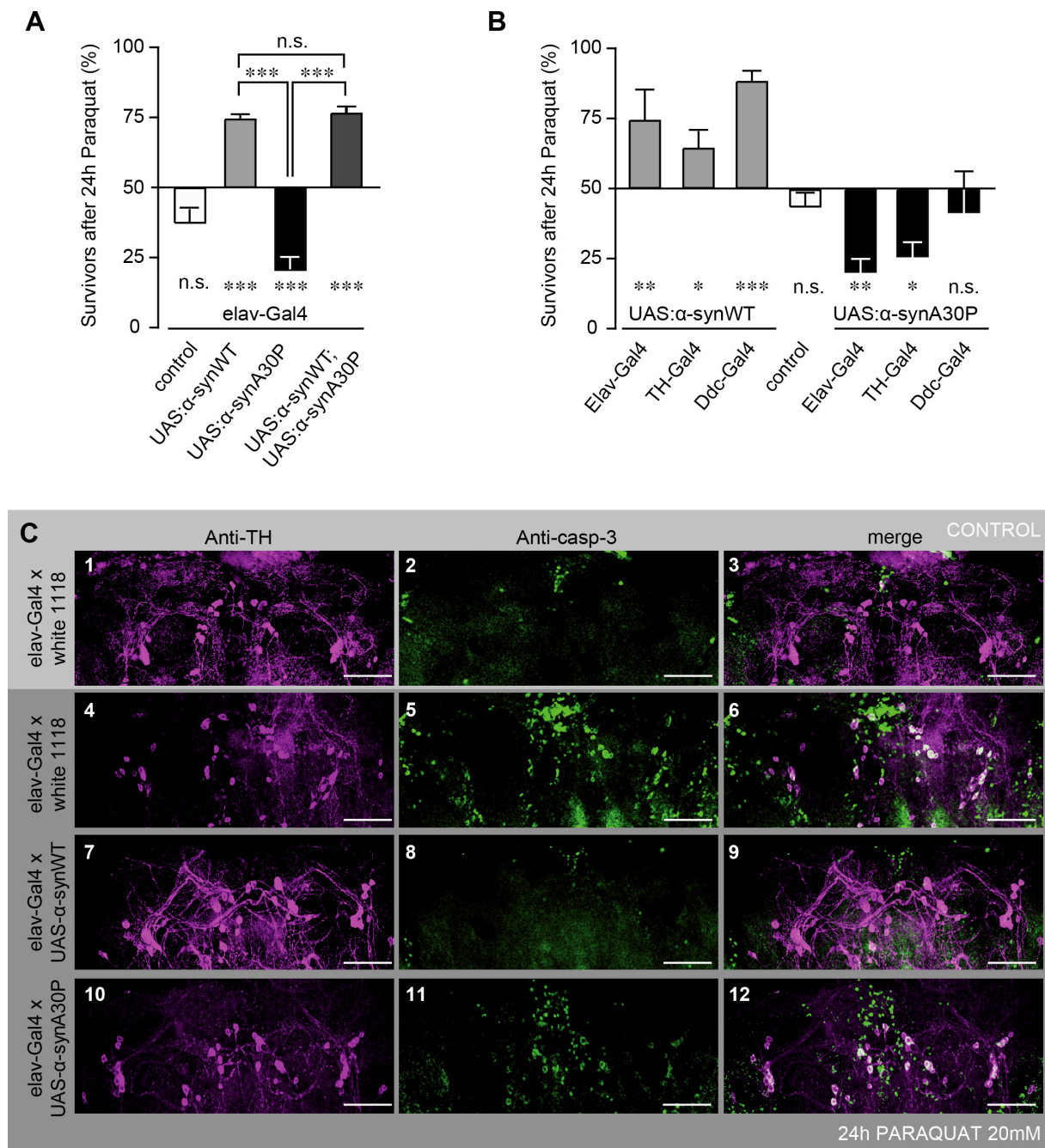


Fig. 5: Opposite effects of α -synWT and α -synA30P on *Drosophila* survival and casp-3 activation under oxidative stress. **A, B. *Drosophila* survival after 24h exposure to 20 mM PQ. **A.** Effect of α -synWT and α -synA30P, or both, expressed in all neurons. Fly survival under PQ oxidative stress is significantly prolonged, or on the opposite shortened, in the presence of pan-neuronal α -synWT or α -synA30P, respectively. Effect of co-expression of both isoforms is not different from the expression of the wild type form alone. **B.** Effect of α -synWT and α -synA30P expressed in dopaminergic neurons. Fly survival under PQ oxidative stress is significantly prolonged when α -synWT is expressed in dopaminergic neurons with**

either *TH-Gal4* or *Ddc-GAL4*. Fly survival is shortened when α -synA30P is expressed in dopaminergic neurons with *TH-Gal4* but not with *Ddc-Gal4*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Wilcoxon signed-rank test. **C.** casp-3 activation in brain dopaminergic neurons under PQ, and opposite effects of pan-neuronally expressed α -synWT and α -synA30P. Immunostaining against cleaved (activated) casp-3 under control conditions (1-3) and after 24 h exposure to 20 mM PQ of controls (4-6) or flies expressing either α -synWT (7-9) or α -synA30P (10-12) in all neurons with *elav-Gal4*. Flies expressing pan-neuronally α -synA30P (10-12) showed casp-3 activation in almost all dopaminergic cell-clusters examined. Flies expressing α -synWT in all neurons (7-9), in contrary to control flies (1-3), do not show any visible activation of casp-3 activity in dopaminergic neurons under PQ-induced oxidative stress.

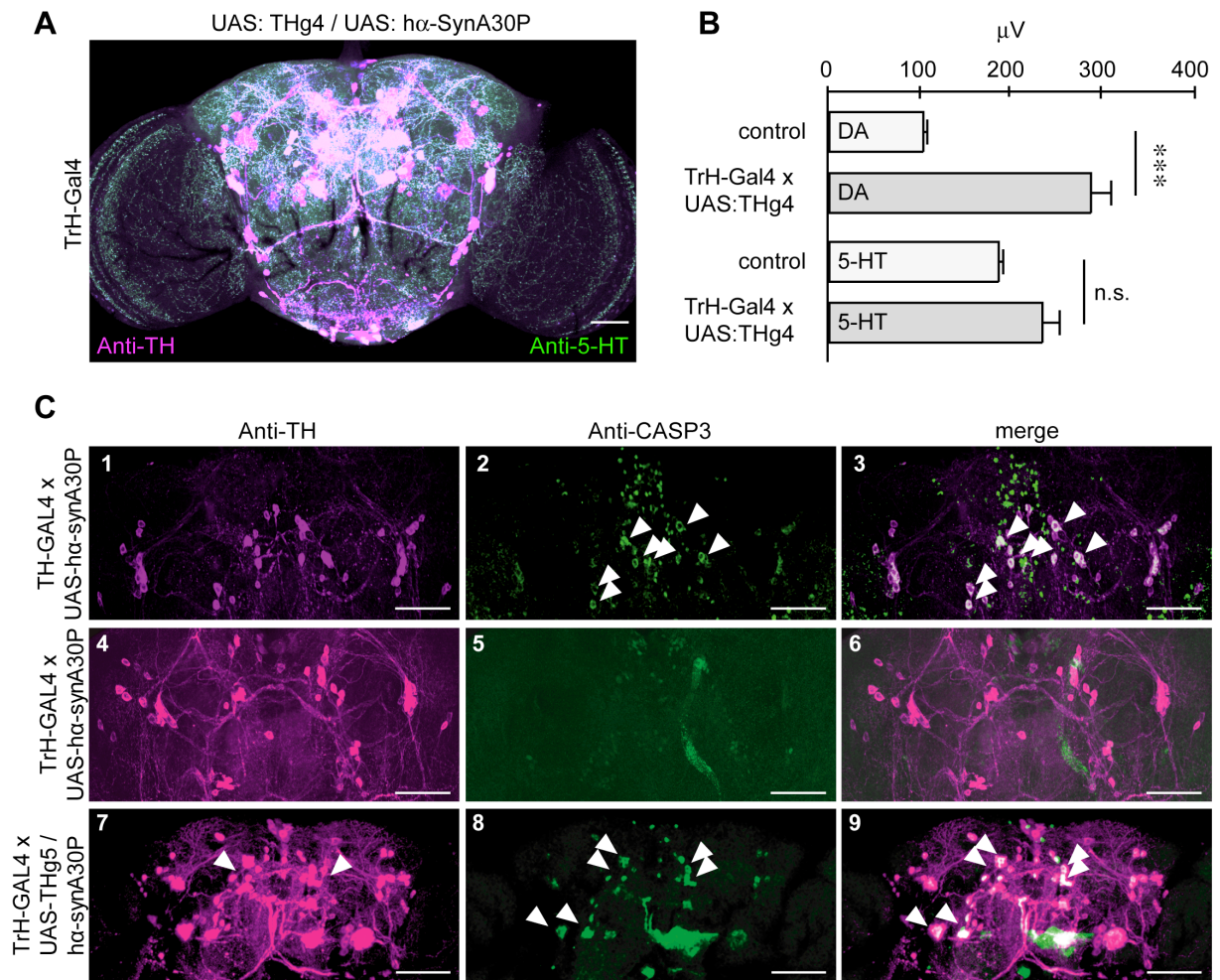


Fig. 6: TH expression in serotonergic neurons makes these cells susceptible to α -synA30P toxicity. **A.** Picture of a *Drosophila* brain showing the ectopic expression of tyrosine hydroxylase (DTH) in serotonergic neurons with TRH-Gal4. Anti-TH (magenta) and anti-5-HT (green) co-immunostainings. Merges appear in white. Scale bar: 50 μ m. **B.** HPLC assays show higher dopamine level in brains of flies expressing TH in serotonergic neurons ($p < 0,001$, Student's t-test). 5-HT levels are not affected ($p > 0,05$, Student's t-test). **C.** Expression of α -synA30P in dopaminergic neurons induces proteolytic activation of casp-3 (1-3), whereas in serotonergic neurons α -synA30P does not induce any pro-apoptotic state of the cells (4-6). In contrast, casp-3 is activated in serotonergic neurons co-expressing TH and α -synA30P.

Chapitre 2 : Une seule voie dopaminergique est à la base des défauts moteurs dans un modèle de la maladie de Parkinson chez la drosophile

Riemensperger T., Nguyễn M.V., Issa S. A.-R., Coulom H., Cassar M., Jacquet M., Pech U., Fiala A. and Birman S.

Article en preparation

Présentation :

Chez la drosophile comme chez les mammifères, la DA est un neuromodulateur qui intervient dans le contrôle de divers processus physiologiques et module de nombreux comportements. Chaque hémisphère du cerveau de la drosophile contient six groupes (*clusters*) de neurones dopaminergiques décrits sur des critères purement anatomiques (Budnik and White 1988; Nässel and Elekes 1992; Monastirioti 1999; Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003; Mao and Davis 2009; Selcho et al. 2009; White, Humphrey, and Hirth 2010).

Le premier modèle transgénique de la MP a été développé chez la drosophile par l'expression pan-neuronale de diverses formes (sauvage ou mutantes) de l' α -syn humaine (Feany and Bender, 2000). Ces auteurs ont observé une perte accélérée des capacités locomotrices des drosophiles avec l'âge, plus prononcée en présence des formes mutantes de l' α -syn (A30P et A53T) associées à des cas familiaux de la MP. L'article qui suit démontre que ce défaut locomoteur progressif, mis en évidence par un test de géotaxie négative, peut être reproduit à l'identique par l'expression de la forme A30P de l' α -syn dans une quinzaine de neurones dopaminergiques seulement, qui font partie du *cluster* PAM. Les résultats obtenus indiquent ces neurones projettent sur les lobes horizontaux β' des corps pédonculés, qui sont eux-mêmes impliqués dans le contrôle locomoteur.

— Dans cette étude, ma contribution expérimentale s'est limitée à quelques immunomarquages.

A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson's disease

Thomas Riemensperger^{1,3,*}, Mỹ Vân Nguyễn¹, Sabi Abdul-Raouf Issa¹, Hélène Coulom², Marlène Cassar¹, M  lanie Jacquet¹, Ulrike Pech³, André Fiala³ and Serge Birman^{1,2,*}

¹ *Genetics and Physiopathology of Neurotransmission, Neurobiology Unit, CNRS, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, F-75231 Paris cedex 5, France*

² *Developmental Biology Institute of Marseilles-Luminy, CNRS, Universit   de la Méditerranée, Campus de Luminy Case 907, F-13288 Marseille cedex 9, France*

³ *Molecular Neurobiology of Behaviour, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institute, Georg-August-University of Goettingen, Schwann-Schleiden Research Center, Julia-Lermontowa-Weg 3, 37077 Goettingen, Germany*

Correspondence to: Serge Birman (serge.birman@espci.fr) and Thomas Riemensperger (triemen@gwdg.de).

Abstract

Expression of the human Parkinson's disease-related protein α -synuclein in all *Drosophila* neurons induces progressive locomotor deficits. Here we identify a group of ~15 dopaminergic neurons in the anterior medial region of the brain whose disruption correlates with climbing impairments in this model. We show that activation of the mushroom body β ' lobes by these dopaminergic neurons is specifically required for an efficient control of startle-induced locomotion in flies.

Main text

Locomotor activity in animals depends on signaling from the brain dopaminergic system (1-3). Loss of midbrain dopaminergic neurons (DNs) cause the motor symptoms of Parkinson's disease (PD), the most frequent neurodegenerative movement disorders in humans (4). A protein of unknown function, α -synuclein (α -syn) was found to be implicated in inherited forms of, PD (5). By ectopic expression of wild type or mutant forms of human α -syn, Feany and Bender (6) developed the first transgenic model of PD in *Drosophila*. Flies expressing α -syn in all neurons show accelerated age-dependent locomotor deficits compared to wild type flies, as monitored by a startle-induced negative geotaxis (SING) assay that measures the climbing behavior of a fly in response to a gentle mechanical shock. This behavioural impairment was accompanied by a gradual loss of ~50% of the cells in a brain DN cluster. Further, depletion of DNs using oxidative stressors such as rotenone or paraquat (7, 8), as well as dopamine deficiency in the fly brain (9), all severely impair the SING behavior. These results highlight the importance of brain dopamine (DA) in locomotor control in *Drosophila*. Here we identify a subset of ~15 DNs in the protocerebral anterior medial (PAM) cluster whose dysfunction appears necessary and sufficient to induce progressive deficits in the SING assay. These neurons selectively innervate the tips of the mushroom body (MB) horizontal lobes. Consistent with this projection pattern, we found that blockade of neuronal activity in the β' , but not the β or γ lobes, of *Drosophila* MBs inhibits the SING behavior.

Here we studied behavioral effects of the mutant form α -synA30P that gave the strongest locomotor impairment in the Feany and Bender's model. In agreement with these authors, we observed that *elav-GAL4; UAS- α -synA30P* flies, in which the PD-associated protein is expressed in all neurons, show accelerated age-dependent decline in SING performance. More selective expression with *Ddc-Gal4* that targets subsets of DNs and of the serotonergic neurons gave quite similar results with this behavior test (Fig. 1A). *Ddc-Gal4* contains regulatory elements from *Dopa decarboxylase*, a gene involved in the serotonin (5-HT) and DA biosynthesis pathway (Fig. S1A,B). Thus, both DA and 5-HT-expressing neurons could

be responsible for the observed phenotype. Importantly, the expression pattern of this driver is incomplete and targets only subsets of the serotonergic or dopaminergic clusters (Fig. S1C). So, we expressed α -synA30P with *TH-Gal4* that expresses in the whole dopaminergic system except the PAM cluster. Surprisingly, this did not induce any age-dependent geotaxis phenotypes (Fig. 1A). Neither did α -synA30P expression in the whole serotonergic system with *TRH-Gal4* (Fig. 1B) provoke any locomotion phenotype (Fig. 1A). Therefore, we concluded that the observed negative geotaxis deficits could be tentatively assigned to the PAM cluster, a specific cluster of ~100 DNs in each hemisphere that is covered by the expression pattern of *Ddc-Gal4* and *elav-Gal4*, but not by *TH-Gal4* (Fig. S1C).

We then expressed α -synA30P with *NP6510-Gal4* (10) in a subset of ~15 DNs within the PAM cluster (Fig. 1B) projecting into the horizontal lobes of the MBs, as visualization of synaptic vesicles with DVGlut::GFP demonstrates (see Fig. 3A). α -synA30P expression with NP6510-Gal4 altered negative geotaxis from the 2nd week after eclosion (a.E.) on (Fig. 1A). Subsequently, we stressed this subset of the PAM neurons through periodical influx of Ca^{2+} ions with the temperature inducible cation channel dTRPA1 on the one hand, or silenced synaptic transmission with *shi^{ts1}* on the other hand. DTRPA1- or *shi^{ts1}*- expressing *NP6510-Gal4* flies were incubated in alternance 12 h at 31°C/12 h at 25°C and their negative geotaxis was tested 21d a.E. at 25°C. Whereas, periodical blocking of synaptic transmission with *shi^{ts1}* did not impair negative geotaxis, sustained elevation of intracellular Ca^{2+} level decreased flies performance (Fig. 2F), comparably to flies expressing α -synA30P of the same age.

[A paragraph about the projection pattern of the NP6510 neurons (Fig. 1C, 2D and 3A-C) is missing here.]

To understand how the PAM neurons stands in relation to the horizontal MB lobes and which role those may play in the negative geotaxis behavior, we either silenced, or activated the different horizontal lobes with *shi^{ts1}* or dTRPA1, respectively and subjected the flies to a negative geotaxis paradigm. We used *c305-Gal4* to target expression in the β' lobes (Fig. 1D1,3,5,F) and *MB247-Gal4* (Fig. 1D2,4,6,G) for β and γ lobes. Surprisingly, we found that

silencing, as well as activation of β' lobes (Fig. 3D), but not of β and γ lobes (Fig. 1F) had similar inhibitory consequences on the climbing activity of the flies.

In conclusion, our results demonstrate, that the SING defects in the PD model of Feany and Bender derive from a gradual dysfunction of a subset of dopaminergic neurons in the antero-medial cluster projecting into the MB horizontal lobes and that the MB horizontal β' lobes play an important role in the control of this behavior in *Drosophila*.

Acknowledgments

SB is supported by the CNRS and this work by research grants from the Agence Nationale de la Recherche and the Fondation de France. HC and TR were supported by fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale and TR by the Fondation Pierre-Gilles de Gennes.

Materials and Methods

Negative geotaxis. Startle-induced negative geotaxis was assayed as previously described (8). Groups of 10 to 20 flies were placed in a vertical column (25 cm long, 1.5 cm diameter) with a conic bottom end. They were suddenly startled by gently tapping them down, to which *Drosophila* respond by climbing up. After 1 min, flies having reached the top of the column (above 20.5 cm) and flies remaining at the bottom end (below 6.5 cm) were separately counted. Three trials were performed at 1 min intervals. The scores are the mean of the numbers of flies at the top ($ntop$) and at the bottom ($nbot$), expressed as percentages of the total number of flies ($ntot$). Results are the mean \pm SEM of the scores obtained in three independent experiments. The performance index (PI) is defined as $1/2((ntot + ntop - nbot)/ntot)$. To test for the effect of aging on negative geotaxis, thirty flies of each condition were evaluated each week throughout a period of eight weeks. Dead flies were replaced by

substitutes of the same age. Statistical analysis was performed on the PIs with the Student's t test.

GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP). (11) For the visualization of connectivity with Kenyon cells, flies of the genotype mb247:DsRed/mb247:DsRed (12)); mb247:CD4_GFP11, UAS:CD4_GFP1-10 (13) , NP6510-Gal4 (DGRC, Kyoto-Inst of Technology) were used. Brains of 5-6 days old females (raised in 25°C, 60%) were dissected and mounted in ringer, with the anterior facing upwards. Image stacks covering 180 µm were taken in 0.6 µm z-steps with a Zeiss LSM7 MP 2-photon microscope and the respective software, using a w-plan apochromat 20x1 water objective, an excitation of 8% Laser power of 950nm, a pixel dwell of 2.3µ sec, an x/y resolution of 0.18 µm/pixel and a line average of 4. GRASP fluorescence and DsRed fluorescence were recorded simultaneously, using a dichroic mirror in combination with 500-550nm and 575-610nm emission filters. To compensate for changes in detected intensity due to the depth of the optical slice within the brain, gain was adjusted manually (8% decrease from deepest to most anterior slice). Images were processed with the Fiji Software (14). For reconstruction Amira 5.3.3 software (Visage Imaging, Inc. Berlin) was used, in particular the function "label field" on either the DsRed channel or the GFP channel of the stack. Based on empiric evaluation of noise and background in control images and based on the respective background noise of each image, an intensity treshold was manually defined. For each channel, pixels above this treshold were labeled and a volumeric surface was generated (smoothed for mushroom body label field, unsmoothed for GRASP label field).

References

1. Beninger, R. J. (1983) *Brain Res* **287**, 173-196
2. Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M. and Caron, M. G. (1996) *Nature* **379**, 606-612
3. Zhou, Q. Y. and Palmiter, R. D. (1995) *Cell* **83**, 1197-1209
4. Forno, L. S. (1996) *J Neuropathol.Exp.Neurol.* **55**, 259-272
5. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S.,

- Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. and Nussbaum, R. L. (1997) *Science* **276**, 2045-2047
6. Feany, M. B. and Bender, W. W. (2000) *Nature* **404**, 394-398
 7. Chaudhuri, A., Bowling, K., Funderburk, C., Lawal, H., Inamdar, A., Wang, Z. and O'Donnell, J. M. (2007) *J Neurosci* **27**, 2457-2467
 8. Coulom, H. and Birman, S. (2004) *J Neurosci* **24**, 10993-10998
 9. Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iche-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., Hirsh, J. and Birman, S. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 834-839
 10. Aso, Y., Siwanowicz, I., Bracker, L., Ito, K., Kitamoto, T. and Tanimoto, H. (2010) *Curr Biol* **20**, 1445-1451
 11. Feinberg, E. H., Vanhoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K. and Bargmann, C. I. (2008) *Neuron* **57**, 353-363
 12. Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E. and Fiala, A. (2005) *Curr Biol* **15**, 1953-1960
 13. Gordon, M. D. and Scott, K. (2009) *Neuron* **61**, 373-384
 14. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) *Nat Methods* **9**, 676-682
 15. Nassel, D. R. and Elekes, K. (1992) *Cell Tissue Res* **267**, 147-167

Figures

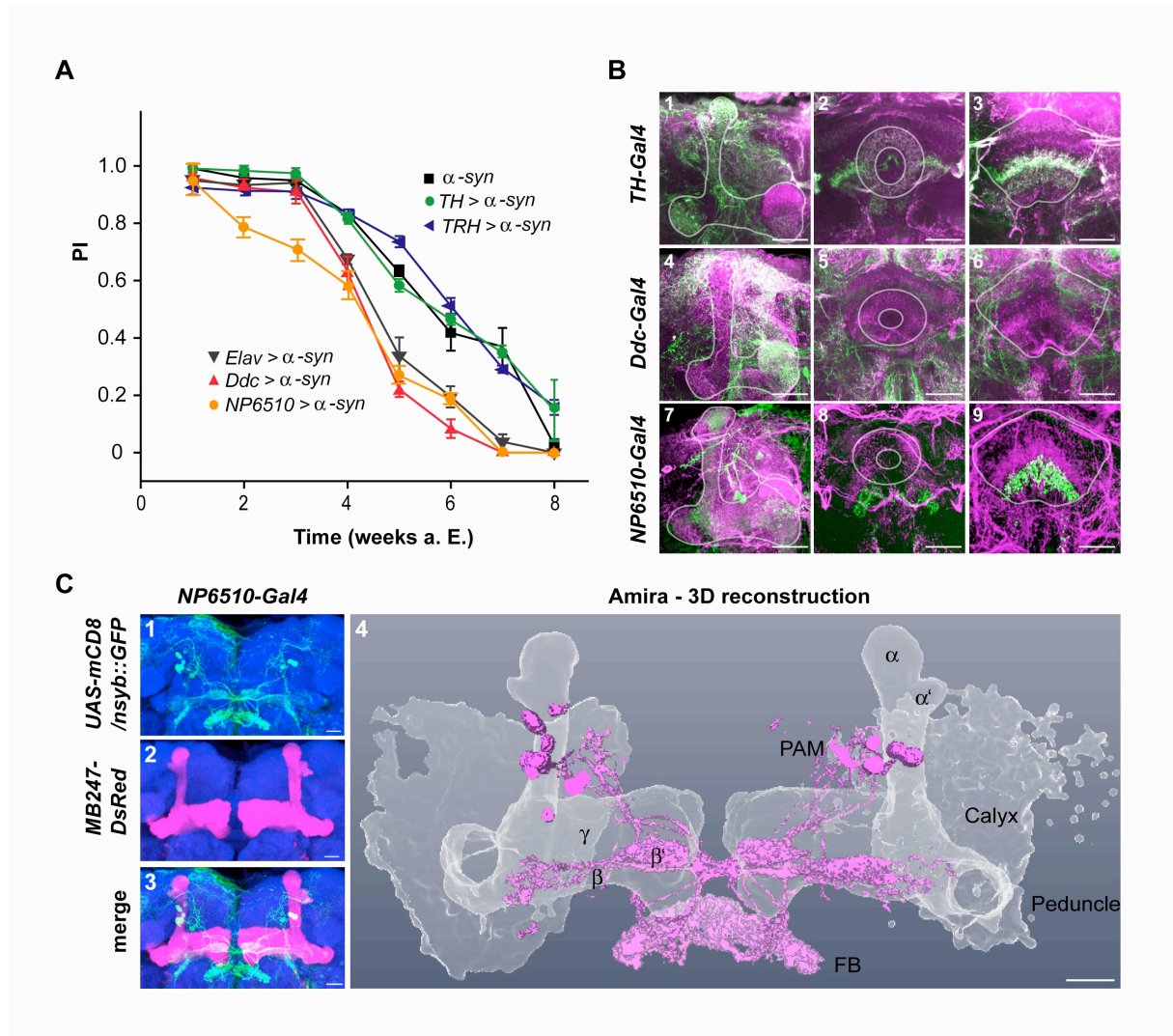


Fig. 1. Expression of α -synA30P in subsets of DA neurons evokes locomotor deficits.

A) Climbing abilities of flies expressing α -synA30P under the transcriptional control of *elav-Gal4* (grey), *TH-Gal4* (green), *Ddc-Gal4* (red), *TRH-Gal4* (blue), *NP6510-Gal4* (yellow) compared to control *UAS- α -synA30P/+* flies (black squares). Negative geotactic behaviour declines steadily over time after the 3rd week. Flies expressing α -synA30P with *elav-Gal4*, *Ddc-Gal4* or *NP6510-Gal4* show strong locomotor impairments (4th week), whereas expression of α -synA30P with *TH-Gal4* or *TRH-Gal4* does not evoke any phenotype compared to control flies. **B)** *TH-Gal4* drives expression mainly in DNs innervating the vertical lobes (1), the fan-shaped body (2) and the ellipsoid body (3), whereas *Ddc-Gal4* mainly labels neurons innervating the horizontal lobes of the mushroom body (4, b, b'), but

only weakly the fan-shaped body (**5**) and the ellipsoid body (**6**). NP6510-Gal4 labels subsets of the PAM cluster neurons innervating the horizontal lobes of the mushroom body (**7, b, b'**), but not the ellipsoid body (**8**), whereas non-dopaminergic neurons innervating the fan-shaped body are strongly labeled with this driver (**9**). *In situ* immunostainings with GFP (*green*) and Anti-TH (*magenta*) antibodies. Co-localizations merge both colours and appear in *white*. Scale bars: 20 μ m. **C**) Innervation pattern of *NP6510-Gal4*-positive PAM neurons. NP6510-Gal4 positive neurons project from the PAM cluster into the horizontal β and β' lobes of the mushroom bodies. *In situ* immunostainings with GFP (*green, 1*) and Anti-FasII (*magenta, 2*) and Anti-nc82 (blue) antibodies. Sale bars: 20 μ m. **(4)** Projections of *NP6510-Gal4* neurons visualized by 3D Amira reconstruction. *NP6510-Gal4*-positive DNs innervate the horizontal mushroom body lobes. Projections of non-dopaminergic neurons of the same cluster pass close to the mushroom bodies and innervate the fan-shaped body.

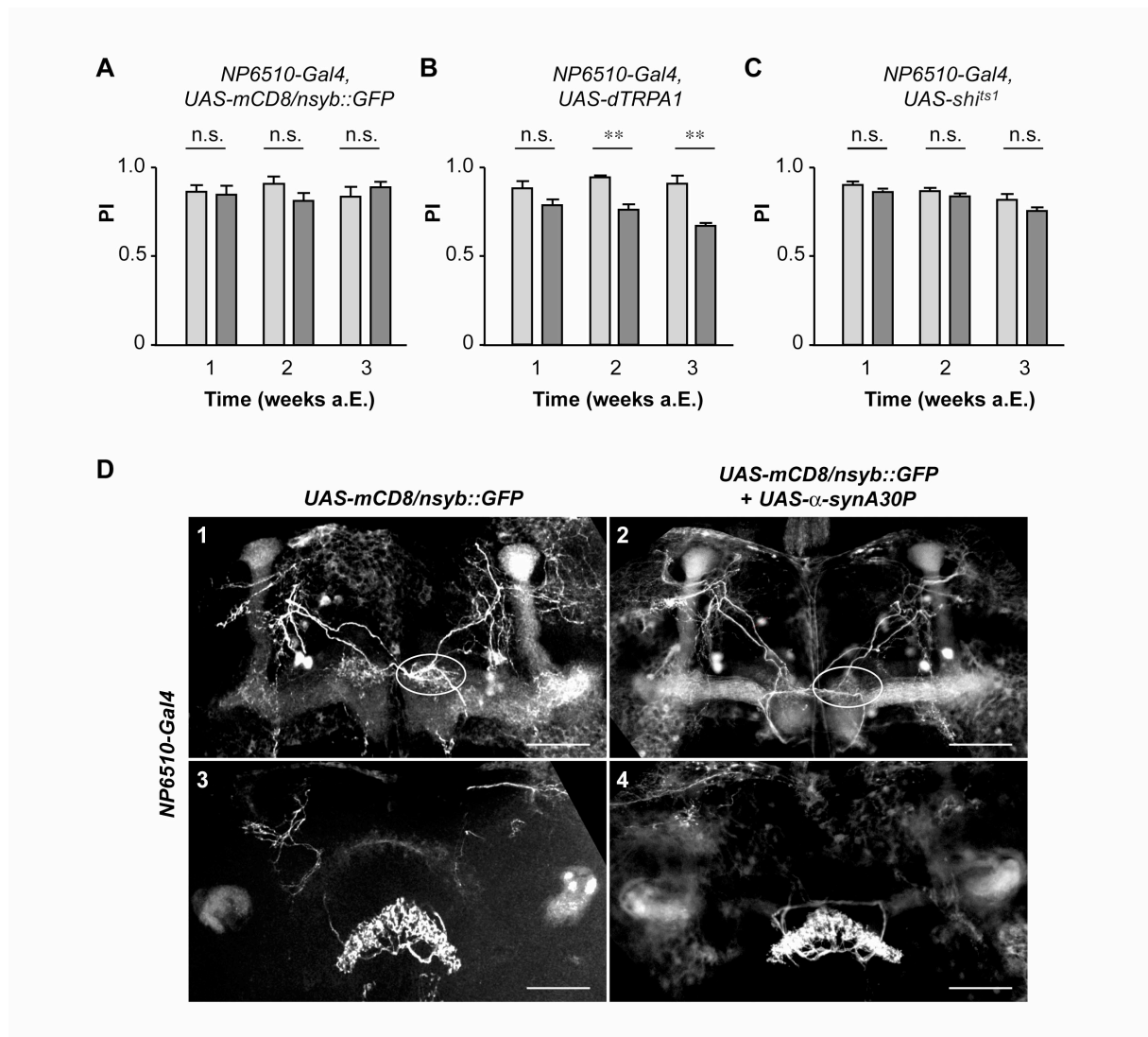


Fig. 2. Elevated calcium stress in *NP6510-Gal4*-positive cells induces age-dependent locomotor impairments. **A-C)** Flies expressing the heat-inducible cation channel dTRPA1 in a subset of PAM neurons show locomotor defects 2 and 3 weeks after eclosion when kept on elevated temperature for 12 h each day (**B**). Flies expressing either GFP as control (**A**) or *shi^{ts1}* that inhibits neurotransmitter release above 30°C (**C**), do not show significant decline in their locomotor performance. *Light gray bars* : Adult flies continuously at 25°C. *Dark gray bars* : Adult flies alternately 12 h at 31°C/12 h at 25°C. Ca^{2+} stress evokes similar negative geotaxis deficits than the accumulation of α -synA30P (compare with Fig. 1A). Two weeks a.E : ** $P < 0,0012$; Three weeks a.E ** $P < 0,0051$; Mann-Whitney U Test. **D)** Expression of α -synA30P with *NP6510-Gal4* reduces dopaminergic innervation of the mushroom bodies in the area of the β' lobes (**1, circle**), compared to control flies flies (**2, circle**). Non-

dopaminergic neurons innervating the fan-shaped body are not affected by the presence of α -synA30P (**3 and 4**). *In situ* immunostainings with anti-GFP antibodies on brains of 10-day old flies. Scale bars: 20 μ m.

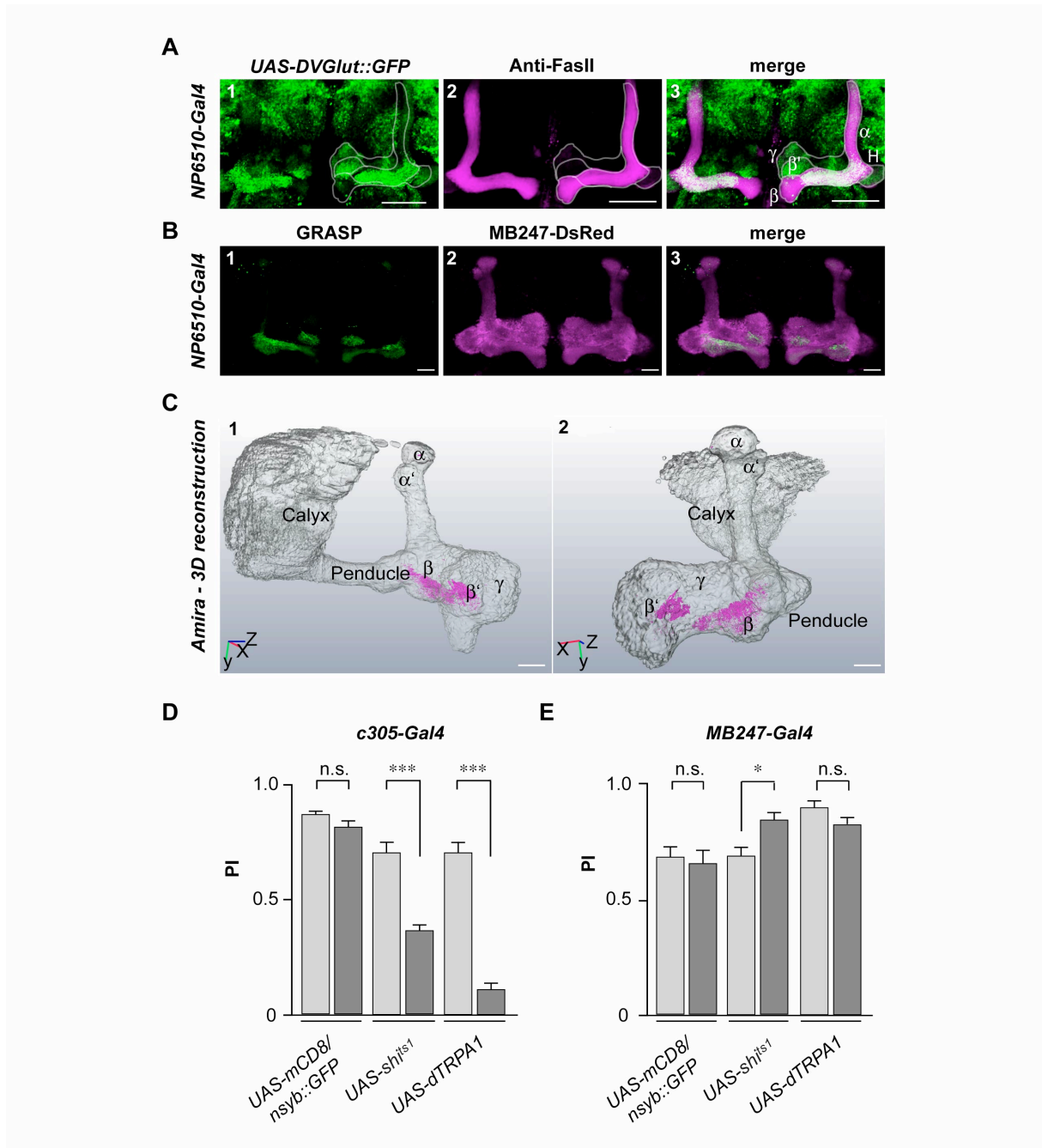


Fig. 3. Activity of the MB β' lobe controls startle-induced locomotion. A-C) MB horizontal lobes receive dopaminergic inputs from *NP6510-Gal4* positive DNs. A) Expression

of the vesicular glutamate transporter (DVGlut) fused to GFP as a synaptic vesicle marker in *NP6510-Gal4* neurons. Counterstaining against Fas II (2) shows that *NP6510-Gal4* neurons are presynaptic to the horizontal lobes of the MBs (1), as can be seen in the merge (3). **B)** Use of the GRASP method to visualize direct connections between *NP6510-Gal4* and MB neurons. The two component-SPLIT-GFP system was employed to visualize spatial vicinity of *NP6510-Gal4* positive cells (1) and MB neurons (2). CD4-SplitGFP11 and MB247-DsRed were co-expressed in a, b and g, as well as in α' and β' lobes, under direct control of the MB-specific promoter MB247. **C)** 3D Amira reconstruction of the GRASP-GFP signal. Lateral (1) and frontal (2) views. Synapses are present in the β lobes and the tip of the β' lobes, but not in the α , α' and γ lobes. Scale bars: 20 μ m. **D)** MB β' lobe signaling interferes with the SING response. Expression of either *shl^{ts1}* or *dTRPA1* under control of the α'/β' driver *c305-Gal4* decreases negative geotaxis performance at elevated temperature. *** $p < 0,0001$. **E)** Artificial activation of α , β and γ lobes with *MB247-Gal4* show no decrease in locomotor performance ($p=0,1431$). Silencing with *shl^{ts1}* rather show a slightly positive effect ($p = 0.0029$). Mann-Whitney U test.

Supplemental figures

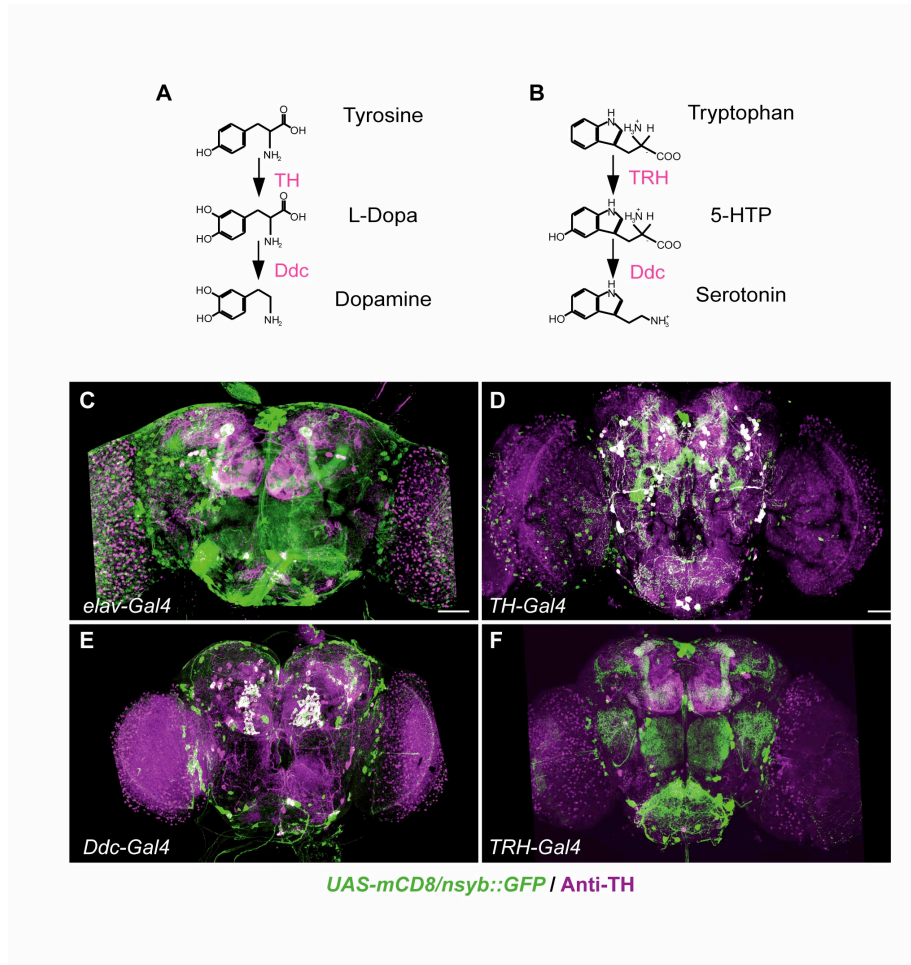


Fig. S1. Brain pattern of Gal4 drivers expressing in *Drosophila* dopaminergic and serotonergic neurons. **A)** Dopamine biosynthesis pathway. L-tyrosine is converted by tyrosine hydroxylase (TH) into L-DOPA, and, in a second step, decarboxylated by Dopa decarboxylase (Ddc) to dopamine **B)** Serotonin biosynthesis pathway. Tryptophan is processed by tryptophan hydroxylase (TRH) into 5-hydroxytryptophan and, in a second step, decarboxylated by Ddc to produce serotonin. **C-F)** In situ co-immunostainings against GFP (green) and TH (magenta). Co-localizations merge both colors and appear in white. **C)** Brain pattern of pan-neuronal *elav-Gal4*. **D.** *TH-Gal4* targets most of the dopaminergic neurons, except for a large part of the PAM (protocerebral antero-medial) cluster. A fraction of DNs in the medulla are not targeted either by this driver. **E.** *Ddc-Gal4* expresses in the PAM cluster and subsets of serotonergic neurons. **F.** *TRH-Gal4* targets the whole brain serotonergic system. Scale bar: 50 μ m.

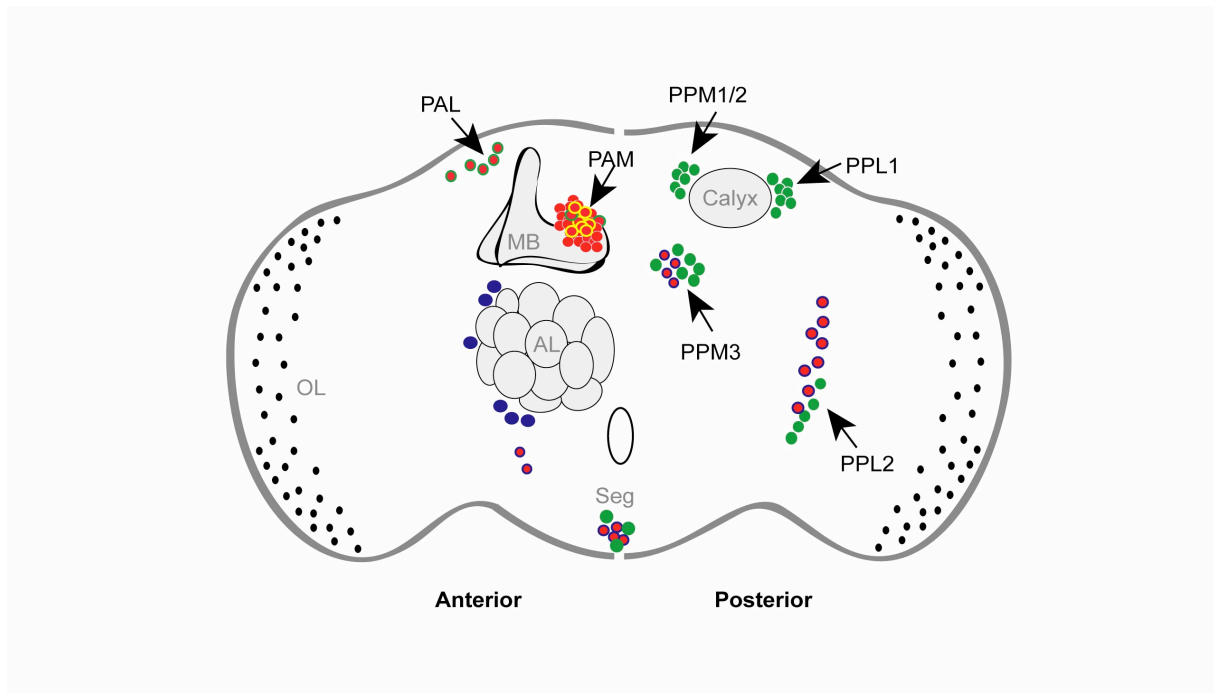


Fig. S2. Dopaminergic clusters and their targeting by various drivers. Schematic depiction of the dopaminergic system in the *Drosophila* brain. Neurons targeted by a specific Gal4 driver are indicated by a color code that corresponds to the colors of the curves in Fig. 1A. PAL – protocerebral antero-lateral; PAM – protocerebral antero-medial; PPM – protocerebral postero-medial; PPL – protocerebral postero-lateral; Mb – mushroom bodies; AL – antennal lobes; SEG – subesophageal ganglion; Me – medulla (open circles – anterior, closed dots – posterior; nomenclature according to (15).

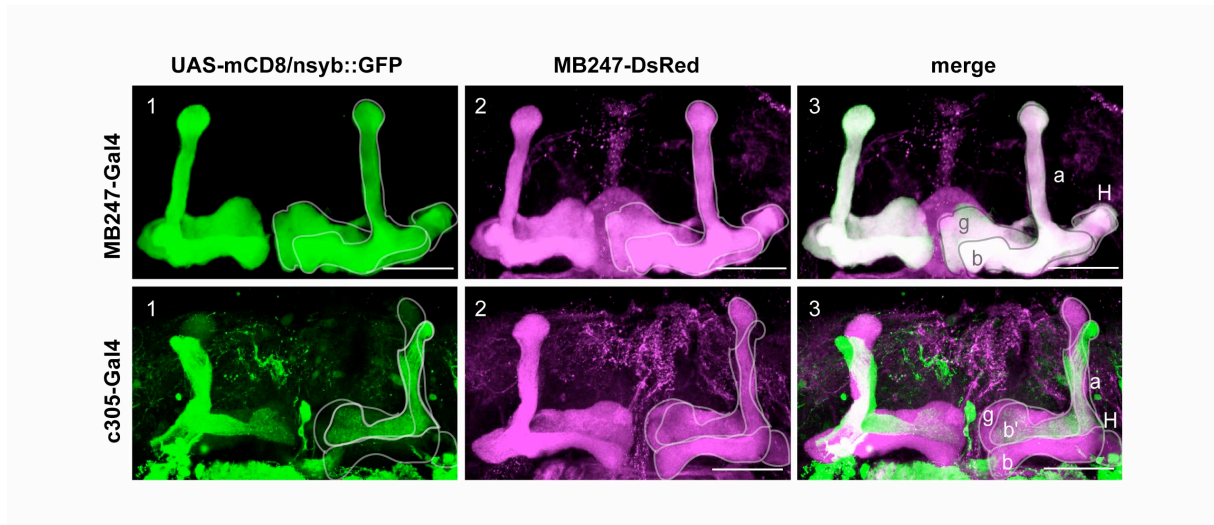


Fig. S3. Expression patterns of mushroom body drivers. Expression pattern of *MB247-Gal4* (1-3) shows staining in α , β and γ lobes, but not in α' and β' . In contrast, *c305-Gal4* (4-6) specifically expresses in α' and β' lobes. Scale bars: 50 μm .

Literature

- 1) Aso et al. (2010) Specific Dopaminergic Neurons for the Formation of Labile Aversive Memory. *Curr Biol.* 20, 1445-1451.
- 2) Chaudhuri A et al. (2007) Interaction of Genetic and Environmental Factors in a *Drosophila* Parkinsonism Model. *J Neurosci*, 27, 2457-2467.
- 3) Coulom H and Birman S. (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*, 24, 10993-8.
- 4) Krueger, R. et al. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genet.* 18, 106-108.
- 5) Feany MB. and Bender WW. (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404: 394-8.
- 6) Forno LS. (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 259-72.
- 7) Polymeropoulos, M. H. et al. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- 8) Sang et al. (2007) A *Drosophila* Model of Mutant Human Parkin-Induced Toxicity Demonstrates Selective Loss of Dopaminergic Neurons and Dependence on Cellular Dopamine. *Neurobiol. Of Disease* 27, 981-992.
- 9) Friggi-Grelin F, et al. (2003) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol* 54: 618-627.
- 10) Lee T, et al.(1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126: 4065-4076.
- 11) Li H, Chaney S, Roberts IJ, Forte M, & Hirsh J (2000) Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 10: 211-214.

- 12) Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* 8, 1787–1802.
- 13) Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, et al. (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5: 52-77.

Chapitre 3 : Etude des mécanismes des neurodégénérescences sur des cultures d'explants de systèmes nerveux centraux entiers de drosophile

Cassar M., Renard J., Magnin R. and Birman S.

Article en préparation

Présentation

Etant donné le caractère progressif des dysfonctionnements neuronaux dans les maladies neurodégénératives, il nous est apparu intéressant de pouvoir suivre ces effets sur les cellules identifiées d'un même SNC pendant plusieurs semaines. Le but de cette étude a donc été de mettre au point une technique qui permettrait de conserver *ex vivo* des explants de SNC entiers de drosophiles adultes pendant une longue durée. Il existe déjà plusieurs techniques publiées permettant de maintenir en culture des cerveaux de drosophiles de larves ou d'adultes, mais ces techniques sont souvent complexes et coûteuses, et pas toujours adaptées aux méthodes d'imagerie. De plus, personne n'a montré jusqu'ici qu'il était possible de conserver de cette façon des SNC adultes entiers de drosophile.

Une partie du travail présenté dans cet article a donc consisté à développer une technique de mise en culture du cerveau encore connecté à la corde nerveuse ventrale, disposé dans une chambre permettant la survie, la complète immobilisation et l'accessibilité au microscope confocale de la préparation, afin de pouvoir effectuer des expériences de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) et d'imagerie calcique. La méthode que nous avons mise au point est très simple à mettre en œuvre, nonobstant les difficultés de la dissection, et permet la conservation de SNC entiers jusqu'à 28 jours en culture en bonne condition de survie. Cela a pu être vérifié par la visualisation des vésicules synaptiques marquées avec la GFP dans des neurones dopaminergiques ou glutamatergiques. Il est possible d'affirmer que les cerveaux restent vivants pendant toute cette période, car les tissus

morts perdent rapidement leur fluorescence et j'ai également pu vérifier leur état de viabilité lors des expériences de FRAP.

Une deuxième partie de ce projet, dont les résultats sont encore préliminaires à ce stade, a consisté à appliquer cette méthode de culture d'explants de SNC entiers à une étude par FRAP des effets de l' α -synA30P sur la dynamique du transport axonal des vésicules. Dans les résultats présentés précédemment (Partie II, chapitre 1), nous avons montré que les varicosités des neurones dopaminergiques de drosophile gonflaient de façon anormale en présence d' α -syn, ce qui suggèrait que le trafic axonal des vésicules synaptiques est gravement perturbé. Nos premiers résultats d'imagerie semblent confirmer que la vitesse de transport des vésicules synaptiques le long des axones dans les neurones dopaminergiques est considérablement diminuée en présence d' α -synA30P, par rapport au contrôle où elle est absente. Bien entendu, ces travaux nécessitent davantage d'expériences pour étudier l'évolution de ces effets au cours du temps, analyser si l' α -syn sauvage induit des défauts similaires et comparer avec les effets observés dans d'autres neurones comme les neurones glutamatergiques.

— Ce travail a été initié alors que j'encadrais deux étudiants en stage, qui m'ont aidé dans la mise au point du protocole de mise en culture. J'ai ensuite continué seule les expériences présentées dans ce chapitre.

Studying mechanisms of neurodegeneration in explant cultures of whole adult *Drosophila* CNS.

Marlène Cassar, Julie Renard, Rémi Magnin and Serge Birman

Genetics and Physiopathology of Neurotransmission, Neurobiology Unit, CNRS, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, F-75231 Paris cedex 5, France

Abstract

Drosophila is now widely used to study human neurodegenerative diseases in a living organism. Such studies generally involve histological analysis of fixed brains from individual flies. Because neurodegeneration is progressive, it would be advantageous in some cases to follow the fate of identified cells in the same brain during several days. This would be, in principle, possible in explant cultures. Here we report a simple procedure to immobilize and maintain alive in culture whole adult fly central nervous systems (CNS) for more than 3 weeks. The survival and cellular integrity of these explants were demonstrated by conducting fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments *in situ* in specific neurons. As a first application of this method, we studied the effect of a mutant form of human α -synuclein (α -synA30P), a pathogenic protein associated to Parkinson's disease. We show here for the first time that α -synA30P markedly decreases synaptic vesicle transport velocity along the axons when this protein accumulates in dopaminergic neurons.

Introduction

Drosophila is now widely used to model in vivo molecular and cellular features of various neurodegenerative diseases (Feany and Bender 2000; Coulom and Birman 2004; Kretzschmar 2005; Yellman et al. 1997; Shulman et al. 2003; Bilen and Bonini 2005; Hirth 2010). These diseases are generally associated with age-dependent progressive loss of neurons in specific regions of the brain, although young-onset forms also exist. Thus, Parkinson disease (PD) is a neurodegenerative disorder prominently characterized by a massive loss in a specific subset of dopaminergic neurons (DNs), whose cell bodies are located in a midbrain nucleus, the *substantia nigra pars compacta*, and which project to the caudate and putamen nuclei in the striatum. Causes leading to this dramatic loss are not yet precisely known. However, about 15 PARK genes like *SNCA*, that encodes the protein α -synuclein (α -syn), *parkin* and *pink1* are associated to forms of the PD (Valente et al. 2004; Hampe et al. 2006; Matsuda et al. 2006; Corti, Lesage, and Brice 2011). Furthermore, toxins like paraquat and rotenone, two strong oxidative stressors (Liou et al. 1997) have been identified as environmental causes of PD (Tanner et al. 2011). In 2000, Feany and Bender developed the first genetic model of PD by ectopic expression of wild type and pathogenic mutant forms of α -syn. They demonstrated that overexpression of α -syn induce DA neurons loss and accelerated locomotor decline over time, an effect accentuated with the mutant forms of the protein.

α -syn is the main component of the Lewy bodies, i.e. characteristic cytoplasmic inclusions present in the neurons of patients suffering of PD and other neurological diseases. Three mutants have been identified in rare families carrying hereditary forms of the disease: A30P; A53T and E46K and. These three mutant forms are more prominent to aggregate than the native protein (El-Agnaf et al. 1998; Narhi et al. 1999). Further studies, mainly performed in yeast, suggested that α -syn is involved in vesicle dynamics inside the cells, inhibiting when it

accumulates transport of vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus (Auluck, Caraveo, and Lindquist 2010). In mammals as in invertebrates, vesicle trafficking is regulated by specific proteins; particularly the SNARE complex. Overexpression of ykt6, a v-SNARE that promotes vesicle fusion has been identified as a suppressor of α -syn toxicity in yeast (Cooper et al. 2006). The N-terminus part of α -syn indeed binds to cell membranes and the A30P mutations decreases this capability (Jensen et al. 1998).

In *Drosophila*, dopamine (DA) is a key modulator of a large set of behaviors, including learning and memory, choice behavior, courtship, arousal and sleep, and locomotion (Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, Kume, et al. 2011; Van Swinderen and Andretic 2011). DN projections and DA receptors are widely distributed in the whole neuropile in the CNS (Han et al. 1996; Sugamori et al. 1995; Monastirioti 1999). Another abundant neurotransmitter in the fly brain is L-glutamate (Glu). Glutamatergic terminals can be found in the optic and antennal lobes, the central complex including the protocerebral bridge, noduli, fan-shaped and ellipsoid bodies, and the subesophageal ganglia (Daniels et al. 2008). Glu is involved in the control of various behaviors in the central brain, such as olfactory memory, vision and circadian rhythm [refs], and most probably other functions. Glu is also used at the neuromuscular junction [NMJ] for muscle contraction in insects (Jan and Jan 1976). The role of Glu at the *Drosophila* larval NMJ has been extensively studied for many years (Koh, Gramates, and Budnik 2000; Collins and DiAntonio 2007), but much less is known about the functioning of the adult NMJ that appears quite different. Thus the Glu reuptake transporter dEAAT1 is present in the adult NMJ while it is absent from the larval NMJ (Rival et al. 2006), Glutamatergic terminals are also widely distributed in the adult ventral nerve cord, particularly in the pro- and mesothoracic ganglia, suggesting a role in the control of flight and locomotion (Cassar et al., submitted).

Studies of neurodegenerative mechanisms in *Drosophila* generally involve histological analysis of fixed brains, using different flies for each experiment. Because neurodegeneration is progressive, with defects that build up slowly over a period of several

weeks, it would be much useful to be able to follow the fate of identified cells in the same brain in the *in vivo* models. This would be, in principle, possible in explant cultures. Methods to maintain alive *Drosophila* brains *in vitro* were previously developed by a few teams (Ayaz et al. 2008; Gu and O'Dowd 2006; J. W. Wang et al. 2003; Gibbs and Truman 1998). These published techniques generally need particular features, e.g. a platinum holder with nylon fiber or microcell membranes (Gu and O'Dowd 2006; Ayaz et al. 2008) and also require preincubating steps. To our knowledge, explant cultures of whole adult *Drosophila* CNS were not described before.

Here, we propose a new method to culture explants of whole adult *Drosophila* CNS that allows to maintain them alive for up to 4 weeks. We used FRAP imaging to assess CNS viability and study synaptic vesicle trafficking along the axons in DNs and glutamatergic neurons (GNs). We found that the average initial speed and amplitude of fluorescence recovery does not vary significantly during the first two weeks of *ex vivo* culture, in both types of neurons. We also found an important decrease in the velocity of synaptic vesicle transport in DNs that express α -syn-A30P after only one day in culture. An enlargement of the axonal fibers accompanies this phenomenon. Taken together, these results suggest that this new CNS culture is an efficient way to address many unresolved physiological issues of *Drosophila* neurodegenerative disease models.

Materials and methods

Fly stocks. All stocks were kept in a 25°C incubator in standard yeast-agar *Drosophila* medium under stable 70% humidity level. The following strains were used: TH-Gal4 (Friggi-Grelin, Iché, and Birman 2003) and VGlut-Gal4 (Cassar et al., submitted) to drive expression in DNs and GNs, respectively, UAS-DVGlut::GFP (Cassar et al., submitted) used as a synaptic vesicle marker and UAS- α -synA30P (Feany and Bender 2000).

Explant cultures of whole adult CNS. To prepare the culture chamber, a punched black adhesive was applied on the bottom of a 40-mm Petri dish. The chamber was sterilized overnight with 70% ethanol and then placed in a laminar flow hood and sterilized again by UV irradiation. 7-day old adult female *Drosophila* were quickly dipped in 70% ethanol before dissection. CNS were dissected in Ca²⁺-free Ringer's solution (in mM: 70 NaCl, 5 KCl, 20 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 120 sucrose, 5 HEPES pH 7.6) to avoid muscle contraction and synaptic excitability. The cuticle of the head was carefully discarded with thin forceps and the CNS were cleaned of surrounding tissues. However, some tracheas were preserved to permit a better absorption of oxygen by the nervous system. Dissected CNS were washed in Ringer's for about 30 min. A drop of 0.5% agarose in Ringer's was added in the center hole of the adhesive in the culture chamber. One or several CNS were quickly laid on the solidified agarose and covered with a thin layer of additional 0.5% agarose. 2 ml of culture medium were added in the chamber and half of the medium was renewed every other day. Composition of the culture medium was: 80% of Schneider's medium, 20% of fetal bovine serum (PAA ref: A11-101), freely adapted from Ayaz et al., 2008. Explants were cultured for up to 4 weeks in a 25°C incubator without CO₂. CNS viability was monitored by visualizing GFP fluorescence in the confocal microscope: the explants were considered alive when they displayed strong fluorescence at low laser intensity with normal features of cell labelling.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP): FRAP experiments were performed on a Nikon A1 confocal microscope. Culture chambers were placed on a microscope slide under a 40X water-immersion objective. Areas of interest were defined according to the amount of synaptic zones and the presence or not of cell bodies in the ventral nerve cord of the drosophila. Photobleaching was performed with a 488-nm laser at 1 frame per second and 100% intensity during about 45 sec. The activation time was adjusted to induce a loss of more than 90% of the fluorescence, such that fluorescence recovery can only originate from mobile elements in the preparation. These conditions were previously described to efficiently

trigger disappearance of GFP fluorescence (Füger et al., 2007). Image recording was performed every 2 min during about 1 hour, i.e. 5 min previous to and 45 min after photobleaching.

Data analysis: Image recordings were analysed with ImageJ 1.43r software. Alignment were performed thanks to the Image stabilizer plugin (authors: Kang Li and Steven Kang), ROI were defined and analysed thanks to ROI Manager Plugin (author: Tiago Ferreira). Statistical analyses were performed with GraphPadPrism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), using ANOVA with *post hoc* Tukey–Kramer or Student's *t* test. Statistical significance in figures: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, n.s not significant.

Results:

Development of a method for explant culture of whole Drosophila CNS

We developed a simple method to culture whole CNS explants that uses a very common ingredient: agarose. The challenge was to find an easy way to prevent the CNS in culture from moving around, to allow for repeated imaging experiments, and still keep the explants alive and undamaged. We prepared small culture chambers by punching a hole in a piece of water-resistant adhesive tape. The hole was filled with a drop of 0.5% agarose, upon which the CNS were laid (Fig. 1A). At first, we tried to trap the explants in the solidifying agarose but this did not really hampered the CNS from moving. Therefore, a thin layer of additional agarose was added to cover the CNS (Fig. 1B).

Viability of the CNS ex vivo

To assess the viability of cultured whole *Drosophila* CNS, we took advantage of the UAS-Gal4 system, a powerful gene expression tool available in *Drosophila* (Brand and Perrimon 1993). We expressed the *Drosophila* vesicular Glu transporter tagged with GFP (DVGlut::GFP), a specific synaptic vesicle marker (Cassar et al., submitted), in DNs with *TH-Gal4* or in GNs with *DVGlut-Gal4*. Fig. 2 shows aspects of the CNS explants expressing DVGlut-GFP in GNs after various times in culture. After 1 day, CNS show a strong fluorescence in GN cell bodies and axons (Fig. 2A). A similar fluorescent signal could be observed after 21 (Fig. 2B, B') or 28 (Fig. C, C') days in culture. Therefore, this method permits survival of the CNS explants *ex vivo* for up to 4 weeks.

Synaptic vesicle dynamics in DNs and GNs

As a first application of this method, we studied by FRAP synaptic vesicle dynamics along axonal tracks in the same living CNS during two weeks. We observed that fluorescent recovery is preserved and does not seem to vary significantly during this period in DNs (Fig. 3A). We analysed initial speed of the fluorescence recovery, which corresponded to the recovery speed between $t = 0$ and $t = 2$ min because fluorescence reached a plateau and did not change much after the second minute of recording (see curves in Fig. 3A). In DNs, speed appeared to be lower after 7 days in culture (average of 3.75 percent per min compared to ~5 after 1 day in culture). However, the speed did not decrease more after 2 weeks (3.75 percent per min) and the differences were not significant at any time ($p > 0.05$, $N=10$, $N=4$ and $N=4$ for 1, 7 and 15 days respectively) (Fig. 3B). Similarly, we observed no significant effect with time on total NF recovery, which amounted in average to 25% of fluorescence recovery at 1 day in culture and around 15-20% at 7 and 15 days (Fig. 3C).

Similar results were found with GNs (Fig. 4A). The initial fluorescence recovery speed seems to decrease between 1 and 15 days in culture (5.5 and 4 percent per min, respectively) (Fig. 4B). The maximal fluorescence recovery also slightly decreased from 30 to 23 % for 1 and

15 days respectively (Fig. 4C). Both variations appeared not significant with the statistics treatment we used ($p > 0.05$, $N=10$ and $N=4$ for 1 and 15 days respectively). These results may suggest however a tendency for vesicle trafficking to decrease over time in both types of neurons.

α -synA30P impairs axonal transport of synaptic vesicles

We then performed similar FRAP experiments on explant cultures of whole CNS dissected from flies expressing *DvGlut::GFP* and human *α -synA30P* in DNs, or *DVGlut::GFP* alone as control. The presence of *α -synA30P* induced a strong decrease in normalized fluorescence recovery after the FRAP experiment that persisted during all along the experiment (Fig. 5A). Quantitative analysis revealed that initial speed was markedly decreased in CNS that express *α -syn-A30P* compare to controls: 2.5 against 5 percent per min, respectively ($p=0.024$, $N=10$ and $N=4$ for 1 and 15 days respectively) (Fig. 5B). Interestingly, the maximal fluorescence recovery was also significantly decreased: 12.5 against 25 percent ($p=0.002$, $n=10$ and $N=4$ for 1 and 15 days respectively) (Fig. 5C).

Discussion

Even if a few techniques exist to culture explants of adult *Drosophila* brain, there was still no method that allowed *ex vivo* analyses of whole adult CNS maintained in a fixed position during all the time in culture. Here we report a new technique that was developed to facilitate studies of neurodegenerative disorders in *Drosophila* models. We show that this procedure preserved both the general structure and physiological properties of the nervous system. In these conditions, the time in culture could be prolonged up to four weeks without any visible detrimental effects on the CNS. Therefore our system should permit long term *ex vivo*

observation of identified cells and advanced *in situ* observations on neurodegenerative disease mechanisms in a living CNS tissue.

We used FRAP experiment to check the viability of the CNS in culture and address the effect of aging or pathological proteins on synaptic vesicle trafficking along the axon. FRAP showed that the velocity of vesicle transport tends to decrease over the course of two weeks in culture, both in DNs and GNs. The same was observed for average fluorescence recovery, a measurement of the total amount of vesicles recruited in the region of interest. Although this effect was consistently observed in each experiment, it is not a very strong decrease and we need to perform more experiments to get statistical significance and confirm this result. Such an effect could result either from CNS aging from a relative dysfunction of the neurons after several days *ex vivo*. It is known that ageing alter neuronal excitability (Papatheodoropoulos and Kostopoulos 1996) and axonal transport (Cross et al. 2008) in the vertebrate CNS. Previous studies also showed that, *in vitro*, axonal transport decreases with age (Cross et al. 2008).

α -syn accumulation plays a central role in PD. Mutations of this protein affect vesicle exocytosis and recycling at the synapse in DNs (Abeliovich et al. 2000). Here we focused on the effect of α -synA30P synaptic vesicle transport in DNs through the axon up to the presynaptic varicosities. We observed a dramatic decreasing effect of α -synA30P on initial speed as well as on average fluorescence recovery, and after only one day in culture, which corresponds to ~8 days after adult eclosion. A strong enlargement of DA axonal varicosities also accompanied this effect (not shown), in agreement with previous observations of our team (Riemensperger et al., unpublished). It was already shown that mutated forms of α -syn are responsible for a decrease in vesicle recycling at synapses (Nemani et al. 2010). Here we provide new evidence for an effect α -synA30P on vesicle trafficking along the dopaminergic axon. These results are in accordance with suspected disturbance of synaptic vesicle trafficking at synapses by α -syn in a pathological state. However, our results

contribute a new finding, i.e. that accumulation of α -synA30P induces global disturbance of vesicle trafficking in the axons as well.

Further studies will focus on the effect of mutated α -syn on synaptic vesicle transport over age, accompanied with anatomical studies. We also wish to study the effect of mutated α -syn on neuronal activity by calcium imaging experiment performed on explants of whole CNS in culture. Our simple culture method should greatly facilitate the use of this technique as well as other brain imaging approaches compared to *in vivo* experiments.

References

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., et al. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239–52.
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211–33. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113313
- Ayaz, D., Leyssen, M., Koch, M., Yan, J., Srahna, M., Sheeba, V., Fogle, K. J., et al. (2008). Axonal injury and regeneration in the adult brain of *Drosophila*. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(23), 6010–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.0101-08.2008
- Bilen, J., & Bonini, N. M. (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annual review of genetics*, 39, 153–71. doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095804
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–15.
- Collins, C. A., & DiAntonio, A. (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology*, 17(1), 35–42. doi:10.1016/j.conb.2007.01.001
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5785), 324–8. doi:10.1126/science.1129462

- Corti, O., Lesage, S., & Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological reviews*, *91*(4), 1161–218. doi:10.1152/physrev.00022.2010
- Coulom, H., & Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(48), 10993–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004
- Cross, D. J., Flexman, J. a, Anzai, Y., Maravilla, K. R., & Minoshima, S. (2008). Age-related decrease in axonal transport measured by MR imaging in vivo. *NeuroImage*, *39*(3), 915–26. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.08.036
- Daniels, R. W., Gelfand, M. V., Collins, C. a, & DiAntonio, A. (2008). Visualizing glutamatergic cell bodies and synapses in *Drosophila* larval and adult CNS. *The Journal of comparative neurology*, *508*(1), 131–52. doi:10.1002/cne.21670
- El-Agnaf, O. M., Jakes, R., Curran, M. D., & Wallace, A. (1998). Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of alpha-synuclein protein implicated in Parkinson's disease. *FEBS letters*, *440*(1-2), 67–70.
- Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson ' s disease, *404*(March).
- Friggi-Grelin, F., Iché, M., & Birman, S. (2003). Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *35*(4), 260–9. doi:10.1002/gene.1082
- Gibbs, S. M., & Truman, J. W. (1998). Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron*, *20*(1), 83–93.
- Gu, H., & O'Dowd, D. K. (2006). Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells in situ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(1), 265–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.4109-05.2006
- Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., & Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Human molecular genetics*, *15*(13), 2059–75. doi:10.1093/hmg/ddl131
- Han, K. a, Millar, N. S., Grotewiel, M. S., & Davis, R. L. (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron*, *16*(6), 1127–35.
- Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & neurological disorders drug targets*, *9*(4), 504–23.
- Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of physiology*, *262*(1), 215–36.
- Jensen, P. H., Nielsen, M. S., Jakes, R., Dotti, C. G., & Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *The Journal of biological chemistry*, *273*(41), 26292–4.

- Koh, Y. H., Gramates, L. S., & Budnik, V. (2000). *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microscopy research and technique*, 49(1), 14–25. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(20000401)49:1<14::AID-JEMT3>3.0.CO;2-G
- Kretzschmar, D. (2005). Neurodegenerative mutants in *Drosophila*: a means to identify genes and mechanisms involved in human diseases? *Invertebrate neuroscience: IN*, 5(3-4), 97–109.
- Liou, H. H., Tsai, M. C., Chen, C. J., Jeng, J. S., Chang, Y. C., Chen, S. Y., & Chen, R. C. (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease. (7), 141–146.
- Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., & Tanaka, K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 281(6), 3204–9. doi:10.1074/jbc.M510393200
- Monastirioti, M. (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microscopy research and technique*, 45(2), 106–21. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19990415)45:2<106::AID-JEMT5>3.0.CO;2-3
- Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., et al. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *The Journal of biological chemistry*, 274(14), 9843–6.
- Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., et al. (2010). Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 65(1), 66–79. doi:10.1016/j.neuron.2009.12.023
- Papatheodoropoulos, C., & Kostopoulos, G. (1996). Age-related changes in excitability and recurrent inhibition in the rat CA1 hippocampal region. *The European journal of neuroscience*, 8(3), 510–20.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 834–9. doi:10.1073/pnas.1010930108
- Rival, T., Soustelle, L., Cattaert, D., Strambi, C., Iché, M., & Birman, S. (2006). Physiological requirement for the glutamate transporter dEAAT1 at the adult *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of neurobiology*, 66(10), 1061–74. doi:10.1002/neu.20270
- Shulman, J. M., Shulman, L. M., Weiner, W. J., & Feany, M. B. (2003). From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Current opinion in neurology*, 16(4), 443–9. doi:10.1097/01.wco.0000084220.82329.60
- Sugamori, K. S., Demchyshyn, L. L., McConkey, F., Forte, M. a, & Niznik, H. B. (1995). A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS letters*, 362(2), 131–8.

- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 119(6), 866–72. doi:10.1289/ehp.1002839
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1158–60. doi:10.1126/science.1096284
- Van Swinderen, B., & Andretic, R. (2011). Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 278(1707), 906–13. doi:10.1098/rspb.2010.2564
- Wang, J. W., Wong, A. M., Flores, J., Vosshall, L. B., & Axel, R. (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell*, 112(2), 271–82.
- Yellman, C., Tao, H., He, B., & Hirsh, J. (1997). Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 4131–6.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., et al. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239–52.
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211–33. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113313
- Ayaz, D., Leyssen, M., Koch, M., Yan, J., Srahna, M., Sheeba, V., Fogle, K. J., et al. (2008). Axonal injury and regeneration in the adult brain of *Drosophila*. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(23), 6010–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.0101-08.2008
- Bilen, J., & Bonini, N. M. (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annual review of genetics*, 39, 153–71. doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095804
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–15.
- Collins, C. A., & DiAntonio, A. (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology*, 17(1), 35–42. doi:10.1016/j.conb.2007.01.001
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5785), 324–8. doi:10.1126/science.1129462

- Corti, O., Lesage, S., & Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological reviews*, *91*(4), 1161–218. doi:10.1152/physrev.00022.2010
- Coulom, H., & Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(48), 10993–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004
- Cross, D. J., Flexman, J. a, Anzai, Y., Maravilla, K. R., & Minoshima, S. (2008). Age-related decrease in axonal transport measured by MR imaging in vivo. *NeuroImage*, *39*(3), 915–26. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.08.036
- Daniels, R. W., Gelfand, M. V., Collins, C. a, & DiAntonio, A. (2008). Visualizing glutamatergic cell bodies and synapses in *Drosophila* larval and adult CNS. *The Journal of comparative neurology*, *508*(1), 131–52. doi:10.1002/cne.21670
- El-Agnaf, O. M., Jakes, R., Curran, M. D., & Wallace, A. (1998). Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of alpha-synuclein protein implicated in Parkinson's disease. *FEBS letters*, *440*(1-2), 67–70.
- Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson ' s disease, *404*(March).
- Friggi-Grelin, F., Iché, M., & Birman, S. (2003). Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *35*(4), 260–9. doi:10.1002/gene.1082
- Gibbs, S. M., & Truman, J. W. (1998). Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron*, *20*(1), 83–93.
- Gu, H., & O'Dowd, D. K. (2006). Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells in situ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(1), 265–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.4109-05.2006
- Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., & Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Human molecular genetics*, *15*(13), 2059–75. doi:10.1093/hmg/ddl131
- Han, K. a, Millar, N. S., Grotewiel, M. S., & Davis, R. L. (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron*, *16*(6), 1127–35.
- Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & neurological disorders drug targets*, *9*(4), 504–23.
- Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of physiology*, *262*(1), 215–36.
- Jensen, P. H., Nielsen, M. S., Jakes, R., Dotti, C. G., & Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *The Journal of biological chemistry*, *273*(41), 26292–4.

- Koh, Y. H., Gramates, L. S., & Budnik, V. (2000). Drosophila larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microscopy research and technique*, 49(1), 14–25. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(20000401)49:1<14::AID-JEMT3>3.0.CO;2-G
- Kretzschmar, D. (2005). Neurodegenerative mutants in Drosophila: a means to identify genes and mechanisms involved in human diseases? *Invertebrate neuroscience: IN*, 5(3-4), 97–109.
- Liou, H. H., Tsai, M. C., Chen, C. J., Jeng, J. S., Chang, Y. C., Chen, S. Y., & Chen, R. C. (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease. (7), 141–146.
- Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., & Tanaka, K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 281(6), 3204–9. doi:10.1074/jbc.M510393200
- Monastirioti, M. (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microscopy research and technique*, 45(2), 106–21. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19990415)45:2<106::AID-JEMT5>3.0.CO;2-3
- Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., et al. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *The Journal of biological chemistry*, 274(14), 9843–6.
- Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., et al. (2010). Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 65(1), 66–79. doi:10.1016/j.neuron.2009.12.023
- Papatheodoropoulos, C., & Kostopoulos, G. (1996). Age-related changes in excitability and recurrent inhibition in the rat CA1 hippocampal region. *The European journal of neuroscience*, 8(3), 510–20.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 834–9. doi:10.1073/pnas.1010930108
- Rival, T., Soustelle, L., Cattaert, D., Strambi, C., Iché, M., & Birman, S. (2006). Physiological requirement for the glutamate transporter dEAAT1 at the adult *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of neurobiology*, 66(10), 1061–74. doi:10.1002/neu.20270
- Shulman, J. M., Shulman, L. M., Weiner, W. J., & Feany, M. B. (2003). From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Current opinion in neurology*, 16(4), 443–9. doi:10.1097/01.wco.0000084220.82329.60
- Sugamori, K. S., Demchyshyn, L. L., McConkey, F., Forte, M. a, & Niznik, H. B. (1995). A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS letters*, 362(2), 131–8.

- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 119(6), 866–72. doi:10.1289/ehp.1002839
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1158–60. doi:10.1126/science.1096284
- Van Swinderen, B., & Andretic, R. (2011). Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 278(1707), 906–13. doi:10.1098/rspb.2010.2564
- Wang, J. W., Wong, A. M., Flores, J., Vosshall, L. B., & Axel, R. (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell*, 112(2), 271–82.
- Yellman, C., Tao, H., He, B., & Hirsh, J. (1997). Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 4131–6.

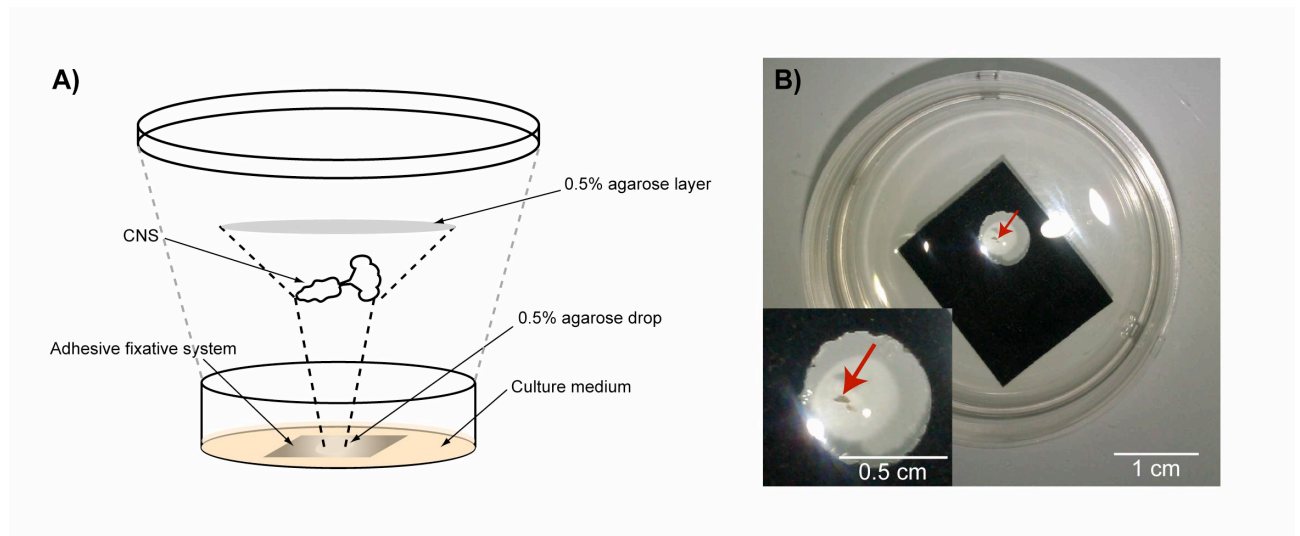


Figure 1: Method for explant cultures of whole *Drosophila* CNS. A) Schematic representation of the culture technique. Dissected whole CNS are placed in a hole punched in an adhesive tape inside a 40-mm Petri dish and filled with a drop of 0.5% agarose. The CNS are then covered with a thin layer of 0.5% agarose and 2 ml of culture medium is added. This system prevents the CNS from moving around. B) Picture of a culture chamber. The inset is an enlargement of the hole that contains one *Drosophila* CNS (red arrows).

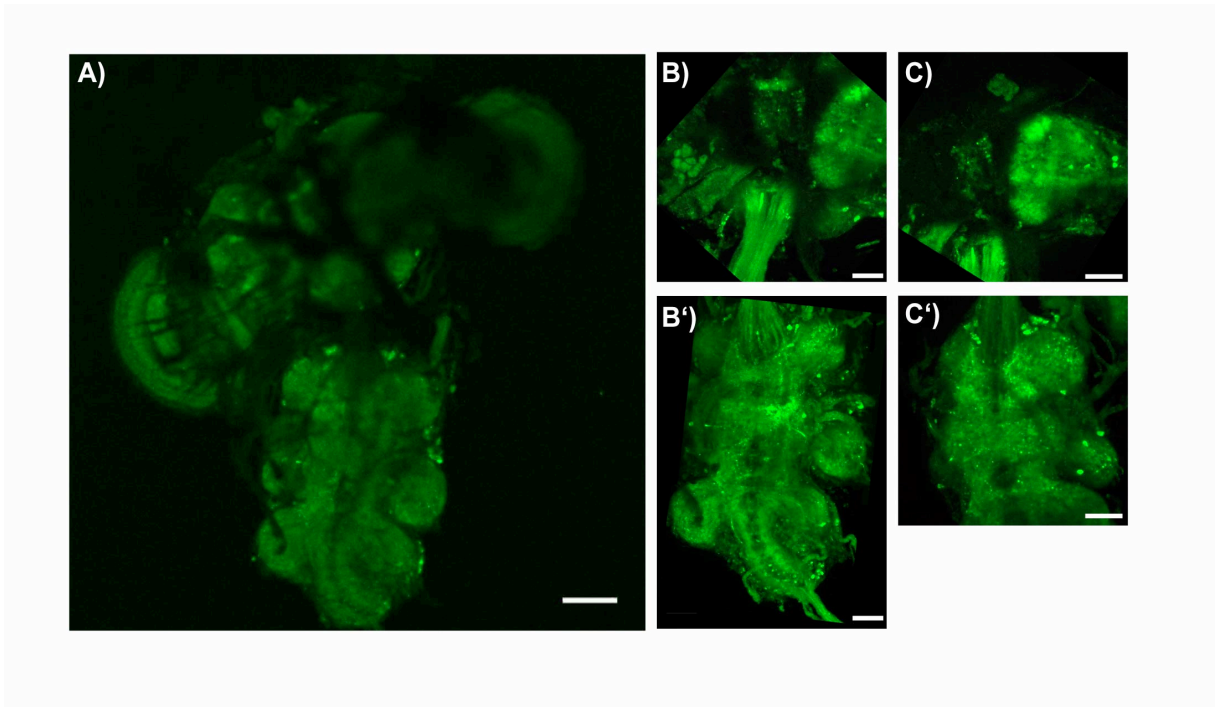


Figure 2: Structure of whole CNS explants at various times of culture. A) Picture of a whole CNS from *DVGlut>DVGlut::GFP Drosophila* showing projections of glutamatergic neurons after 1 day in culture. B, B') Picture of a brain (B) and a ventral nerve cord (B') after 21 days in culture. C, C') Picture of a brain (C) and a ventral nerve cord (C') after 28 days in culture. GFP fluorescence intensity and structure of the CNS are well preserved after several weeks in culture. Scale bars: 100 μm in A and 50 μm in B-C'.

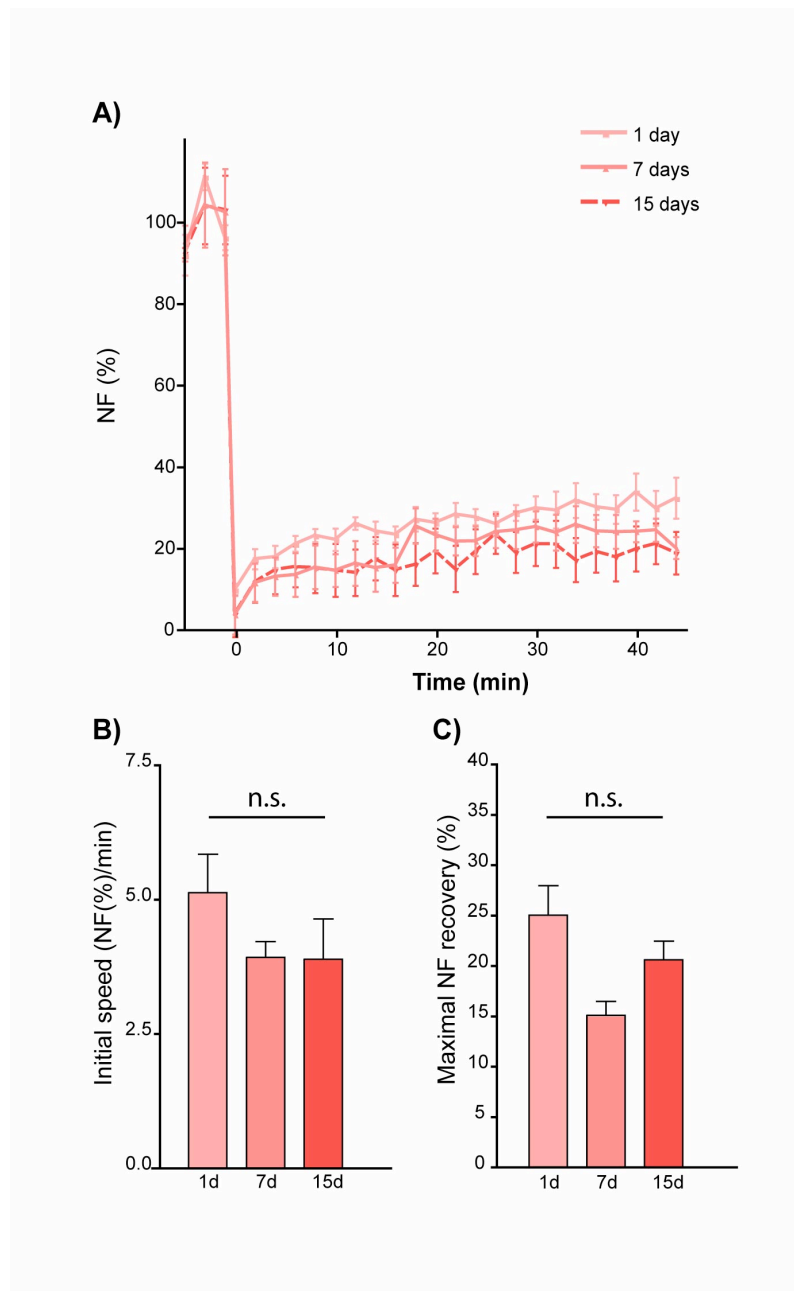


Figure 3: Axonal transport of synaptic vesicles in DNs of cultured CNS. A) Monitoring of FRAP in explant CNS from *TH>DVGlut::GFP Drosophila* after 1, 7 and 15 days in culture. Data are presented as normalized fluorescence (NF) over time (min) in percentage of the pre-activation value. B) Initial speed of fluorescence recovery after 1, 7 and 15 days of culture. No significant decrease could be observed during this period. C) Maximal fluorescence recovery over 45 min at 1, 7 and 15 days of culture. No significant decrease with age could be observed. Data are represented in average of percentage normalized

fluorescence

recovery

(NF(%)).

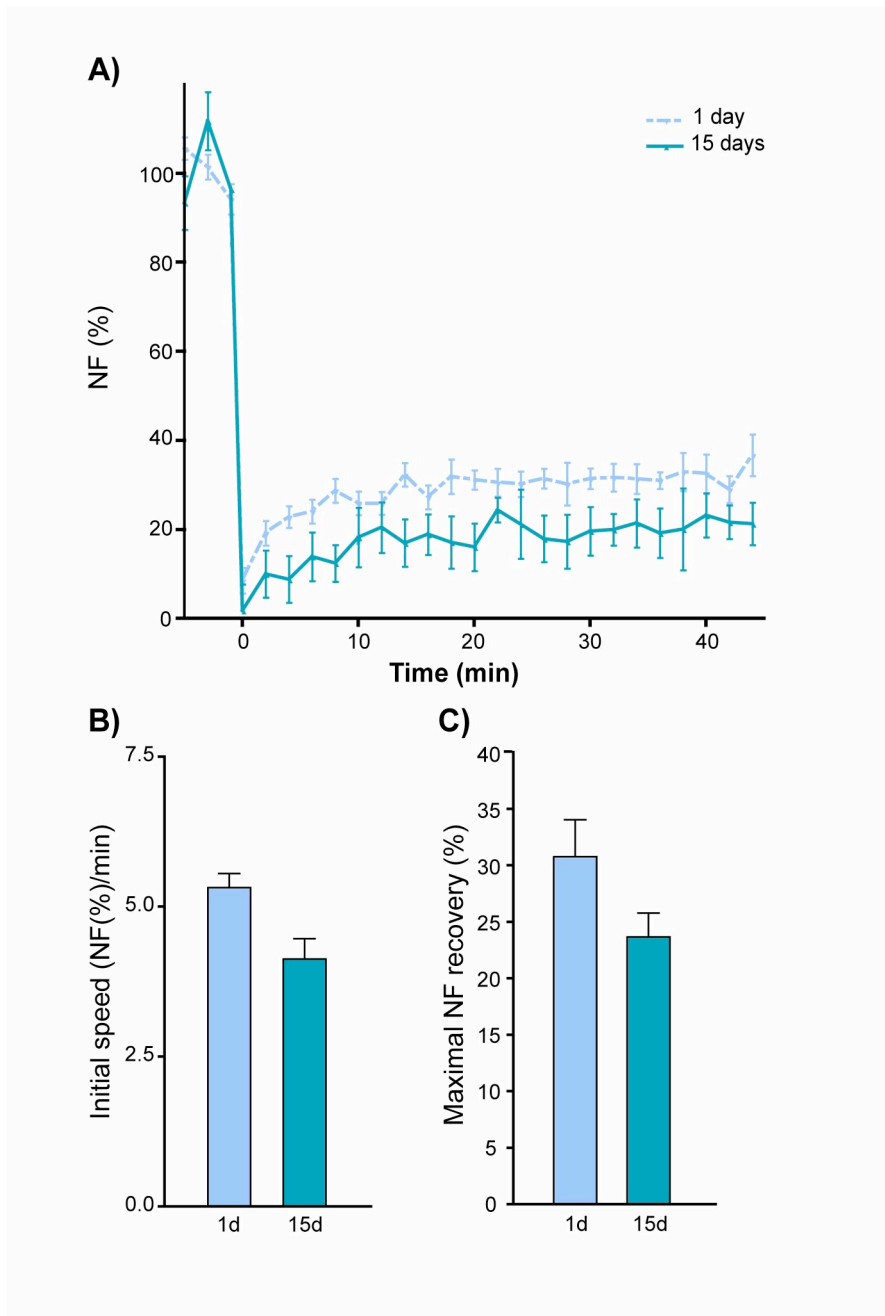


Figure 4: Axonal transport of synaptic vesicles in GNs of cultured CNS. A) Monitoring of FRAP in explant CNS from *DVGlut>DVGlut::GFP Drosophila* after 1 and 15 days in culture. B) Initial speed of fluorescence recovery after 1 and 15 days of culture. C) Maximal fluorescence recovery over time at 1 and 15 days of culture. Velocity of synaptic vesicle dynamics decreased with age in GNs. Same data representation as in Figure 3.

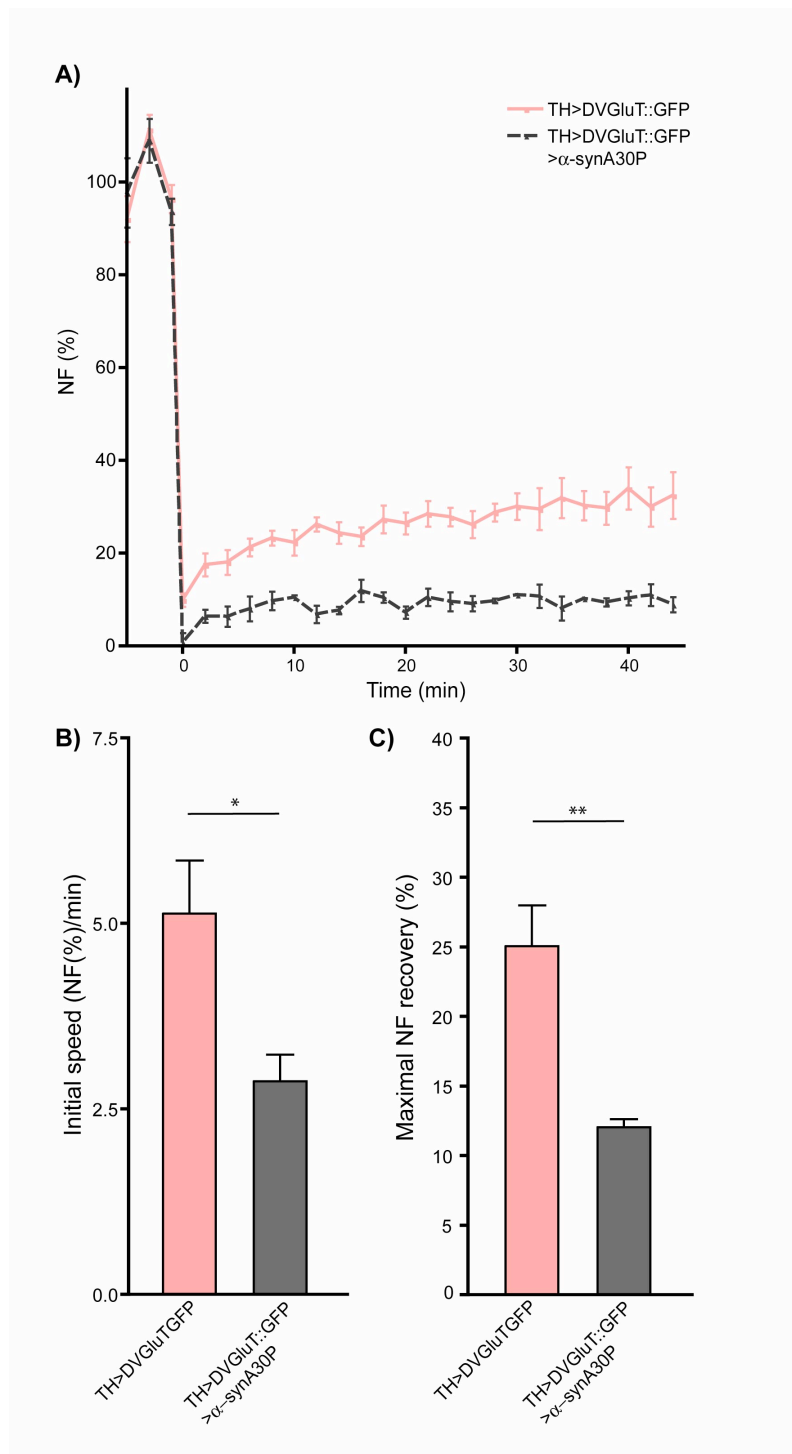


Figure 5: Effect of α -syn-A30P on axonal transport of synaptic vesicles in DNs. A) FRAP recovery in CNS from *TH>DVGlut::GFP* co-expressing α -syn-A30P or not in DNs, after 1 day in culture, B) Initial speed of fluorescence recovery. C) Maximal fluorescence recovery over time after 1 day in culture. Velocity of axonal transport is dramatically decreased in the presence of α -syn-A30P. Same data representation as in Figure 3.

Etude des propriétés physiologiques des neurones d'horloge LNV par imagerie calcique.

Cassar M., Arave R., Klarsfeld A. and Birman S.

Laboratoire de Neurobiologie, CNRS, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris,

Données supplémentaires

Résumé

Les neurones d'horloge contrôlent la périodicité des fonctions physiologiques et du comportement au cours du cycle jour-nuit. Chez la drosophile, un sous-groupe ventral de neurones d'horloge latéraux (LNV) exprime le neuropeptide PDF (*pigment-dispersing factor*). Même si les circuits formés par ces neurones sont assez bien caractérisés (Helfrich-Förster, Nitabach, and Holmes 2011), de nombreuses inconnues persistent sur les neurones efférents et afférents à ces neurones d'horloge. Un des projets de l'équipe concerne l'identification des neurones situés anatomiquement et fonctionnellement en amont ou en aval des neurones LNV. L'étude préliminaire présentée ici visait à tester s'il était possible d'enregistrer des réponses calciques dans les neurones LNV en utilisant le système de culture d'explants de cerveaux entiers de drosophile décrit auparavant (Partie II, chapitre 3).

La méthode utilisée est décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les premiers résultats ont permis d'obtenir avec le senseur calcique GCaMP3 une réponse à un stimulus dépolarisant au KCl à 150 mM (Fig. 1). Dans une même préparation, on obtenait régulièrement un neurone répondant au stimulus pendant que le neurone à PDF voisin ne s'activait pas. Ce phénomène n'a pas pu être expliqué mais étant donné le nombre encore insuffisant d'expériences, on peut imaginer soit qu'il s'agit d'un problème technique, soit que l'activation d'un des deux neurones entraînerait l'inactivation de l'autre. Deux phases ont pu être distinguées dans la réponse des neurones : une première phase qui correspond sans doute à la réponse propre du neurone et une seconde qui pourrait être l'activation par le

réseau des neurones à PDF, réseau qui sera étudié plus profondément dans la suite du projet.

Ces premiers résultats sont encourageants car ils montrent que la technique de culture des SNC entiers de drosophile convient bien à l'imagerie calcique. Les futures expériences viseront à confirmer ces premiers résultats en utilisant des doses décroissantes de KCl ainsi que des agents connus pour activer les neurones à PDF tels que la dopamine. Il sera ensuite envisageable d'effectuer de plus amples expériences sur le réseaux des neurones afférents et efférents aux neurones d'horloges de la drosophile.

— Ces expériences ont été effectuées avec l'aide d'une étudiante américaine en début de licence venue pour un stage d'été.

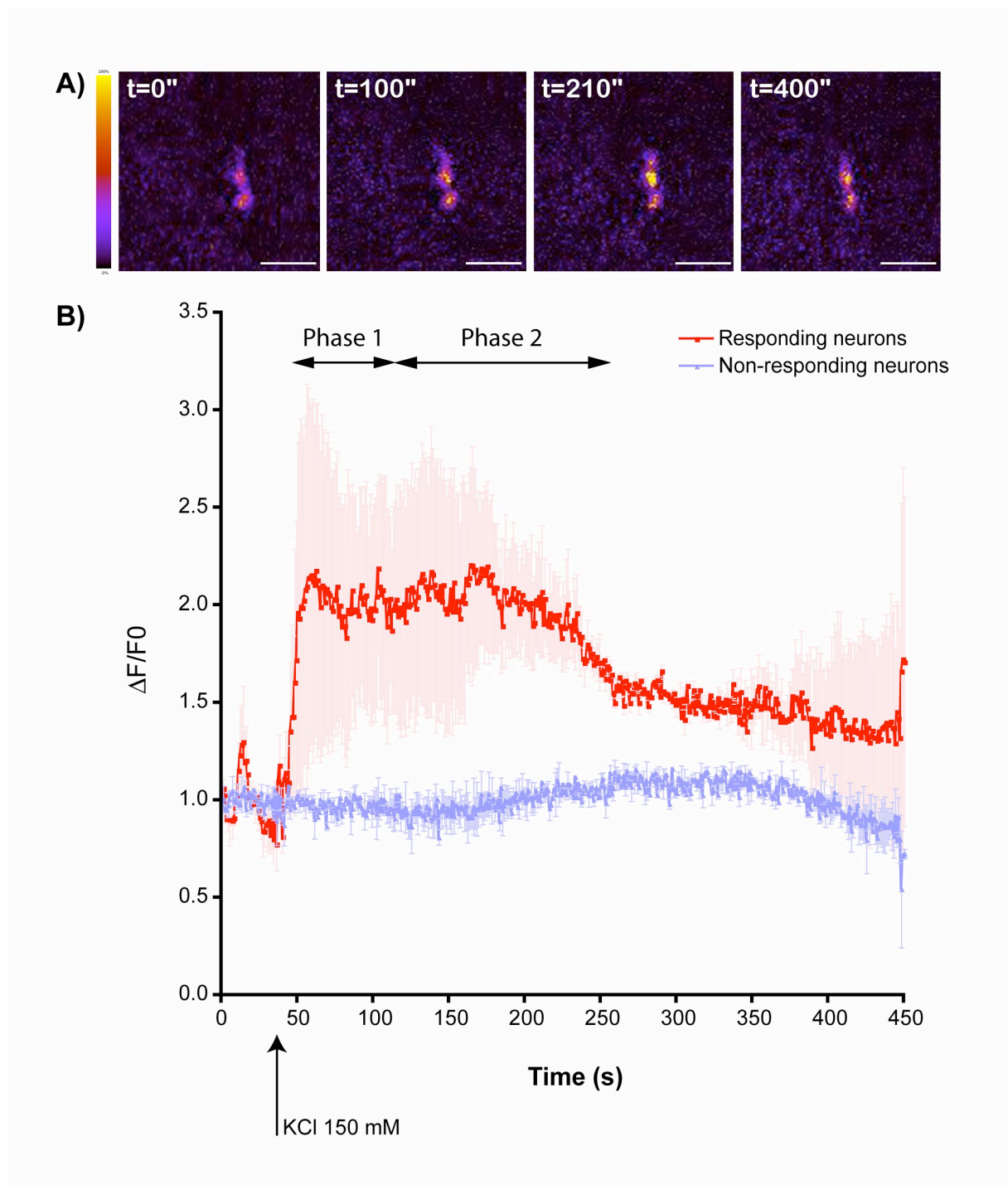


Fig. 1: Réponse des neurones à PDF à une dépolarisation par le KCl. **A)** Réponse de deux neurones en fonction du temps. On peut voir qu'un seul neurone répond à l'application de KCl (150 mM) alors que l'autre ne semble pas être activé par le stimulus. **B)** Le graphique représente la moyenne des réponses normalisées des neurones ayant bien répondu

(courbe rouge) ou n'ayant pas répondu (courbe bleu) dans deux expériences indépendantes avec les écarts standard médian (traits rouges clairs ou bleus clairs).

Discussion

Le sujet de ma thèse a porté sur l'étude de deux causes majeures d'induction de la MP : d'une part, les causes environnementales, en analysant la neurotoxicité du PQ, et d'autre part, les causes génétiques, en étudiant les effets progressifs d'une accumulation neuronale de l' α -syn. Je me suis également attachée à étudier les interactions entre des deux modes d'induction de la MP. Dans ce contexte, le choix de la drosophile s'est imposé à moi tant les avantages de ce modèle sont nombreux. En effet, outre leur facilité d'utilisation, les drosophiles expriment de nombreux gènes conservés chez les mammifères ou associés à des maladies chez l'homme.

1 Le paraquat dans l'étude de la MP

Malgré de nombreuses études indiquant que le PQ est un facteur de risque dans la MP, ce pesticide reste toujours très utilisé dans de nombreux pays d'Asie ou même aux Etats-Unis (Anon.). Pourtant, on sait qu'il provoque un stress oxydatif délétère, le plus souvent mortel, dans l'ensemble des tissus et plus particulièrement au niveau du système nerveux, Les cas de suicide au paraquat restent encore très élevés, notamment au Brésil (Vale, Meredith, and Buckley 1987; Neves et al.; Dinis-Oliveira et al. 2008), et il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement contre les cas d'intoxication.

Au cours de ma thèse, j'ai tenté de comprendre le mode de fonctionnement du PQ, plus particulièrement au niveau du cerveau. La partie I présente les résultats que j'ai obtenus sur ce sujet, divisée en deux chapitres: 1) l'étude de l'altération de la machinerie de biosynthèse des miARNs, 2) l'étude de l'implication de la dopamine dans la toxicité du PQ.

1.1 Les miARNs : une cause ou une conséquence de la MP ?

Alors que de nombreuses preuves de l'altération de ces petites molécules d'ARN dans la MP s'accumulent, il reste encore beaucoup d'inconnues quant à leur implication dans la pathogénèse de cette maladie et, de façon plus générale, dans les maladies neurodégénératives. Les études qui ont été menées jusqu'à présent ont permis d'identifier des variations du niveau d'expression de certains miARNs en condition pathologique (Miñones-Moyano et al. 2011; Gehrke et al. 2010; J. Kim et al. 2007; Bilén et al. 2006; N. Liu et al. 2012; Abe and Bonini 2012; Junn and Mouradian 2012). Cependant, leurs cibles restent encore dans l'ensemble peu connus. Dans le cas de la MP, une sous-régulation du gène codant pour miR-133b a été rapportée (J. Kim et al. 2007). Ce miARN, qui est exprimé spécifiquement dans les neurones dopaminergique du mésencéphale, participerait à leur différenciation en inhibant l'expression de l'une de ses cibles majoritaires, l'homéoprotéine Pitx3. Ce résultat constitue l'une des premières indications de l'implication des miARNs dans la MP.

Au cours de ma thèse, j'ai effectué des expériences préliminaires qui suggèrent que la machinerie responsable de la synthèse et de l'activité des miARNs est altérée spécifiquement dans les neurones dopaminergiques en condition de stress oxydatif. Ces observations ouvrent de nombreuses perspectives. D'une part, la voie de biosynthèse des miARNs fait intervenir de nombreux partenaires protéiques dont les niveaux d'expression dans les mêmes conditions pourraient être vérifiés. D'autre part, il serait intéressant de savoir si le blocage de la machinerie des miARNs est une cause ou une conséquence du dysfonctionnement neuronal induit par le stress oxydatif. Une possibilité serait d'inactiver spécifiquement par ARNi certaines protéines de la machinerie des miARNs, comme par exemple le gène dicer-1, et d'en examiner les conséquences sur les neurones dopaminergiques.

Les résultats obtenus avec le biosenseur AutomiR lors d'une intoxication au PQ suggèrent que les neurones dopaminergiques qui expriment la GFP, et qui ont donc une machinerie des miARNs inactive, présentent en général une diminution significative du marquage TH. Il

est possible que cet effet soit lié à la présence de la GFP elle-même. En effet, une étude précédente chez la drosophile a établie qu'il existe un lien entre l'accélération de l'induction de défauts locomoteurs au cours du temps et la présence de la GFP dans certains types cellulaires, suggérant que l'utilisation de la GFP dans un contexte de stress devrait sans doute être évitée (Mawhinney and Staveley 2011). Cependant, dans notre cas, la quantité de GFP synthétisée à partir de l'AutomiR est très modérée, et le co-marquage de neurones dopaminergiques avec la TH et la GFP est monnaie courante dans notre laboratoire. Il est donc probable que la baisse d'expression de la TH dans les neurones soit liée à l'inhibition de la machinerie des miARNs plutôt qu'à la présence de la GFP.

Une conclusion directe que l'on peut tirer de ces résultats, est que la machinerie des miARNs est très sensible au stress oxydatif, au moins dans les neurones dopaminergiques. Les miARNs jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cellulaire (Castoldi and Muckenthaler 2012; Brandt et al. 2012; Meng, Wang, and Lin 2012; Cohen et al. 2011). Il est donc possible que leur dysfonctionnement entraîne une aggravation de l'état global de la cellule en stress. Cette hypothèse pourrait ainsi suggérer que les miARNs soient de bons candidats dans les recherches de thérapie pour ces maladies, par exemple, en essayant de mimer leurs effets dans les cellules en dégénérescence. A l'inverse, l'altération de la machinerie des miARNs pourrait constituer une défense du neurone contre le stress oxydatif, qui permettrait de désinhiber l'expression de certains gènes neuroprotecteurs comme les protéines Hsp ou d'autres. Si c'était vrai, un blocage temporaire de la machinerie des miARNs pourrait avoir dans certains cas un effet positif.

1.2 Une forte implication de la signalisation dopaminergique dans la pathologie

Dans la mesure où les neurones dopaminergiques de la substance noire sont la cible principale de la MP, il est soupçonné depuis longtemps que la dopamine est impliquée dans la pathogenèse de la maladie. Ainsi, le catabolisme de la dopamine génère du stress oxydatif, ce qui pourrait en partie expliquer la susceptibilité spécifique des neurones

dopaminergiques envers les réactifs oxydants. Bien que le PQ soit aujourd'hui reconnu comme un facteur de risque de la MP, son mode d'action reste encore en partie mal compris. Il a longtemps été considéré comme agissant de façon analogue au MPTP, à cause de la ressemblance structurale des deux molécules. On pense maintenant qu'il pénètre, comme le MPTP, dans les neurones dopaminergiques via le transporteur de la dopamine chez les mammifères (Rappold et al. 2011). Cela nécessiterait une conversion en sa forme monovalente réactive (PQ⁺) dans le milieu extracellulaire par des enzymes comme la NADPH oxidase microgliale. D'autres transporteurs comme le transporteur de cation inorganique Oct3 permettrait au PQ de pénétrer sous cette forme dans d'autres neurones.

Un effet protecteur paradoxal de la dopamine contre la toxicité du PQ chez la drosophile avait été mis en évidence dans un précédent article (Chaudhuri et al. 2007). Une partie importante de mon projet a consisté à étudier par quels mécanismes la dopamine module la neurotoxicité du PQ. Nos résultats suggèrent que l'action toxique du paraquat implique l'activation d'un récepteur dopaminergique, le récepteur DAMB, connu chez la drosophile pour son implication dans les processus mnésiques et dont l'activation induit une augmentation simultanée du Ca²⁺ et de l'AMPC dans le cytosol. J'ai ainsi montré qu'une partie de la neurotoxicité du PQ pourrait être liée à la suractivation de ce récepteur au niveau des neurones glutamatergiques, sous l'effet d'une libération anormale de dopamine, du stress oxydatif, ou de l'action directe du PQ sur DAMB, générant au final un phénomène délétère pour le système nerveux de type excitotoxique.

J'ai également observé que l'expression ectopique de DAMB dans tous les neurones ou dans les neurones dopaminergiques, entraîne la mort des drosophiles au stade pupal tardif, en l'absence de stress oxydatif d'origine exogène. Au cours du développement des drosophiles, chaque période de mue s'accompagne d'un pic de libération de dopamine, le dernier pic accompagnant la pupaison étant le plus important. Il est possible que la mort observée au moment de la pupaison, lorsque DAMB est exprimé dans tous les neurones, soit due à une suractivation brutale de ce récepteur à ce moment précis de la vie de la drosophile. Cette hypothèse est en accord avec l'effet létal de la dopamine lorsque ce

neurotransmetteur est appliqué sur des drosophiles décapitées (résultat non présenté). La dopamine ajoutée suractiverait les récepteurs DAMB et donc les neurones glutamatergiques de la corde nerveuse ventrale. Des expériences d'imagerie calcique et d'électrophysiologie pourraient permettre de vérifier l'activation de DAMB dans le corde ventrale sous l'effet de la dopamine ou du PQ.

2 L' α -synucléine dans l'étude de la MP

L'accumulation intraneuronale de l' α -syn, le composant majoritaire des corps de Lewy, semble être une des causes majeures de la MP. Cette protéine ne possède pas d'homologue structural chez la drosophile, alors que tous les autres acteurs génétiques de la maladie, soit ~15 gènes sont conservés dans ce modèle. Il est donc probable que les interacteurs normaux de l' α -syn sont présents chez la drosophile. Reste à savoir pourquoi l' α -syn n'est pas exprimée et s'il existe une autre protéine fonctionnellement homologue qui joue le rôle de l' α -syn chez cet organisme. Il est maintenant largement accepté que les espèces toxiques ne sont pas les agrégats fibillaires présents dans les corps de Lewy mais des oligomères solubles de l' α -syn (Auluck, Caraveo, and Lindquist 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à des travaux tentant d'évaluer la toxicité d'une forme pathogène de cette protéine causée par la mutation A30P dans le modèle drosophile. Cette étude m'a amené à développer une technique de mise en culture de systèmes nerveux entiers pour pouvoir étudier *in situ* le devenir des neurones dopaminergiques en dégénérescence sous l'effet de l' α -syn.

2.1 Une forte toxicité de l' α -synucléine A30P pour les neurones dopaminergiques de la drosophile

Une partie de mon travail de thèse a consisté à comparer les effets de deux formes de l' α -syn : la forme sauvage et la forme mutante A30P. Ainsi, avec d'autres membres de l'équipe,

j'ai participé à l'étude de défauts spécifiques liés à l'expression de ces protéines, comme l'apparition précoce de troubles locomoteurs, décrits initialement par (Feany and Bender 2000). Ce travail nous a permis d'identifier un groupe d'environ 15 neurones dopaminergiques, faisant partie du cluster PAM qui serait impliqué dans le contrôle de la locomotion chez la drosophile. L'expression de l' α -synA30P dans ce petit groupe de neurones entraîne les mêmes déficits locomoteurs que son expression dans les 200 000 neurones du cerveau de la drosophile. Ces neurones innervent spécifiquement les lobes horizontaux β' des corps pédonculés. Les corps pédonculés sont connus pour être le siège de la mémoire olfactive chez la drosophile, mais on sait aussi qu'ils interviennent dans le contrôle de l'activité locomotrice (Helfrich-Förster, Wulf, and de Belle 2002; J. R. Martin, Ernst, and Heisenberg 1998; Serway et al. 2009). Nos résultats suggèrent un rôle essentiel de la signalisation dopaminergique dans le contrôle de la locomotion par les corps pédonculés

Une autre partie de mon travail de thèse a consisté à mettre en évidence des ressemblances mais également des différences dans les modes d'actions des formes sauvage et mutée A30P de l' α -syn. De façon générale, même si ces protéines pathogènes n'entraînent pas de neurodégénérescence évidente des neurones dopaminergiques chez la drosophile, nous avons établi que tant la forme sauvage que la forme mutée sont capables d'induire de graves dysfonctionnements lorsqu'elles sont exprimées dans ces neurones. Ceux-ci sont caractérisés par une diminution de la biosynthèse de la dopamine et des défauts morphologiques des mitochondries, qui grossissent anormalement ou fusionnent, ainsi que des varicosités axonales, qui grossissent elles aussi par l'accumulation de vésicules synaptiques. Les conséquences physiologiques sont sans doute une perte de la libération normale de la dopamine qui serait responsable de la déficience progressive des capacités locomotrices. Chez les mammifères en effet, il est connu que l' α -syn l'intervient dans la libération des neurotransmetteurs et que sa surexpression conduit à des dérégulations de la libération synaptique de la dopamine (Lundblad et al. 2012). De plus, l'accumulation de l' α -syn mutée ou sauvage semblent inhiber l'expression des protéines PINK1 et parkine qui sont

impliquées dans la dynamique mitochondriale et plus particulièrement dans le contrôle qualité des mitochondries. Cela pourrait expliquer au moins en partie les défauts de structure des mitochondries observés dans le modèle et peut-être jouer un rôle dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP.

C'est lorsque nous avons entrepris l'étude des interactions éventuelles entre les mécanismes cytotoxiques du PQ et de l' α -syn, les deux facteurs de risque de la MP que nous avons choisi d'étudier, que nous avons mis en évidence des différences majeures dans la neurotoxicité des formes sauvage (α -synWT) et mutante (α -synA30P) de l' α -syn. En effet, l'expression de l' α -synA30P dans tous les neurones mais également seulement dans les neurones dopaminergiques induit une aggravation globale de la réponse au PQ, qui se traduit par une diminution de la survie des drosophiles. Nous avons observé que le PQ induit une activation de casp-3, une caspase effectrice pro-apoptotique dans les neurones dopaminergiques, après 24 h d'exposition à la toxine. Cette activation est augmentée en présence d' α -synA30P. Ces résultats suggèrent que la forme mutée est très toxique pour les neurones dopaminergiques. Ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs obtenus *in vitro* sur des cellules en culture (Choong and Say 2011; S. S. Park and Lee 2006).

A l'inverse, et de façon surprenante, la forme sauvage de l' α -syn semble avoir un effet protecteur contre le stress oxydatif induit par le PQ. En effet, en présence d' α -synWT exprimée dans tous les neurones ou sélectivement dans les neurones dopaminergiques, les drosophiles ayant ingéré du PQ survivent plus longtemps en moyenne et les neurones dopaminergiques ne présentent plus de casp-3 activée. Ces résultats démontrent *in vivo* l'effet neuroprotecteur et anti-apoptotique de l' α -syn sauvage dans les neurones dopaminergiques, en accord là encore avec des données antérieures obtenues *in vitro* (C A da Costa, Ancolio, and Checler 2000; Sidhu, Wersinger, and Vernier 2004; Jin et al. 2011).

De plus, nous avons observé que la toxicité de l' α -synA30P n'est pas autonome mais a besoin de la présence de dopamine pour s'exprimer. En effet, alors que les neurones sérotonergiques de drosophile ne sont normalement pas affecté par l' α -synA30P et

n'activent pas la casp-3 en présence de cette protéine, l'expression de la TH dans ces neurones leur confère à la fois la propriété de synthétiser la dopamine et d'activer la casp-3 en présence d' α -synA30P. On sait que la dopamine peut interagir avec l' α -syn et induire des changements conformationnels de cette protéine qui pourraient jouer un rôle dans la pathologie (Martinez-Vicente et al. 2008; Outeiro et al. 2009). Nos résultats indiquent que l'interaction directe ou indirecte avec la dopamine est une cause probable de la sélectivité neuronale des effets délétères de l' α -synA30P, au moins dans le modèle drosophile.

Dans les formes sporadiques de la MP, l' α -syn n'est pas *a priori* mutée. Nos résultats suggèrent qu'initialement, la forme sauvage de la protéine serait protectrice contre le stress oxydatif. Cependant, nous avons également montré qu'au cours du temps, l' α -synWT induit un dysfonctionnement général des neurones dopaminergiques, avec des effets spectaculaires sur la structure des mitochondries et des axones. L'ensemble de ces troubles pourrait mener à terme à une dégénérescence globale des neurones dopaminergiques et à l'induction des premiers symptômes de la MP. Ces résultats indiquent donc un double rôle pour l' α -syn, d'abord neuroprotecteur et anti-apoptotique, puis délétère au fur et à mesure que cette protéine s'accumulerait de façon anormale.

3 Avancées technologiques

L'un des enjeux majeurs de la thèse a été de développer de nouvelles techniques ou d'en améliorer d'autres. Ainsi, j'ai passé beaucoup de temps en début de thèse à mettre au point les conditions permettant d'obtenir un niveau de reproductibilité satisfaisant pour les expériences de survie en présence de PQ, que ce soit par ingestion ou application de la toxine sur drosophiles décapitées. En même temps, j'ai adapté et simplifié une méthode colorimétrique d'évaluation de la quantité de nourriture ingérée par les drosophiles, qui m'a valu d'être pour la première fois co-auteur d'un article scientifique (Riemensperger, Isabel, Coulom, Neuser, Seugnet, and Kume 2011). J'ai longuement mis au point et optimisé la méthode de culture d'explants de SNC entiers de drosophiles afin de pouvoir suivre le

devenir des neurones sur une longue période, allant jusqu'à un mois, et ainsi observer les effets de l' α -syn au cours du temps. Il a fallu également développer des techniques connues mais non utilisées en routine dans l'équipe, comme le FRAP et l'imagerie calcique. Ces techniques d'imagerie ouvrent la voie à l'étude de l'influence de l' α -syn sur le transport axonal des vésicules synaptiques ou des mitochondries au cours du temps. Les premiers résultats que j'ai obtenus semblent indiquer que l' α -syn provoquerait un ralentissement quasi total de la vitesse de transport des vésicules. Cependant, il reste à détudier les effets physiologiques que cela peut entraîner sur les capacités de transmission des neurones dopaminergiques. Il est probable que l'altération du bon fonctionnement synaptique des neurones dopaminergiques, ainsi que l'altération de la dynamique des mitochondries sont en partie responsables de leur dégénérescence,

En conclusion, les travaux effectués au cours de ma thèse pourront, je l'espère, contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes neurotoxiques des facteurs environnementaux et génétique de la MP, bien que de nombreuses questions restent encore en suspens. De plus, les techniques de culture et d'imagerie que j'ai introduites devraient non seulement initier de nouvelles collaborations au sein de l'équipe et avec d'autres laboratoires, mais également permettre de répondre à certaines questions spécifiques de physiopathologie cellulaire qui sont difficiles à étudier *in vivo* pour des raisons évidentes et qui ne peuvent être abordées *in vitro* en l'absence d'une structure tissulaire organisée. Mon souhait est que les hypothèses soulevées par ces travaux et leur continuation conduisent un jour à de nouvelles voies thérapeutiques dans la MP.

REFERENCES :

- Aasly, Jan O, Carles Vilariño-Güell, Justus C Dachsel, Philip J Webber, Andrew B West, Kristoffer Haugarvoll, Krisztina K Johansen, et al. 2010. "Novel Pathogenic LRRK2 p.Asn1437His Substitution in Familial Parkinson's Disease." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 25 (13) (October 15): 2156–63. doi:10.1002/mds.23265.
- Abbott, R D, H Petrovitch, L R White, K H Masaki, C M Tanner, J D Curb, A Grandinetti, P L Blanchette, J S Popper, and G W Ross. 2001. "Frequency of Bowel Movements and the Future Risk of Parkinson's Disease." *Neurology* 57 (3) (August 14): 456–62.
- Abe, Masashi, and Nancy M Bonini. 2012. "MicroRNAs and Neurodegeneration: Role and Impact." *Trends in Cell Biology* (September 28). doi:10.1016/j.tcb.2012.08.013.
- Abeliovich, A, Y Schmitz, I Fariñas, D Choi-Lundberg, W H Ho, P E Castillo, N Shinsky, et al. 2000. "Mice Lacking Alpha-synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System." *Neuron* 25 (1) (January): 239–52.
- Aguirre, Jesús, and J David Lambeth. 2010. "Nox Enzymes from Fungus to Fly to Fish and What They Tell Us About Nox Function in Mammals." *Free Radical Biology & Medicine* 49 (9) (November 15): 1342–53. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027.
- Aharon-Peretz, Judith, Hanna Rosenbaum, and Ruth Gershoni-Baruch. 2004. "Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews." *The New England Journal of Medicine* 351 (19) (November 4): 1972–7. doi:10.1056/NEJMoa033277.
- Almeida, Claudia G, Davide Tampellini, Reisuke H Takahashi, Paul Greengard, Michael T Lin, Eric M Snyder, and Gunnar K Gouras. 2005. "Beta-amyloid Accumulation in APP Mutant Neurons Reduces PSD-95 and GluR1 in Synapses." *Neurobiology of Disease* 20 (2) (November): 187–98. doi:10.1016/j.nbd.2005.02.008.
- Andretic, R, and J Hirsh. 2000. "Circadian Modulation of Dopamine Receptor Responsiveness in *Drosophila Melanogaster*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4) (February 15): 1873–8.
- Andretic, Rozi, Bruno van Swinderen, and Ralph J Greenspan. 2005. "Dopaminergic Modulation of Arousal in *Drosophila*." *Current Biology : CB* 15 (13) (July 12): 1165–75. doi:10.1016/j.cub.2005.05.025.
- Anon. *COMMUNIQUÉ DE PRESSE N° 45/07*.
- . "Paraquat: Labor Saver - Farm Chemicals International Website - Farm Chemicals International - Article."

- Ashrafi, G, and T L Schwarz. 2012. "The Pathways of Mitophagy for Quality Control and Clearance of Mitochondria." *Cell Death and Differentiation* (June 29). doi:10.1038/cdd.2012.81.
- Aso, Yoshinori, Igor Siwanowicz, Lasse Bräcker, Kei Ito, Toshihiro Kitamoto, and Hiromu Tanimoto. 2010. "Specific Dopaminergic Neurons for the Formation of Labile Aversive Memory." *Current Biology: CB* 20 (16) (August 24): 1445–51. doi:10.1016/j.cub.2010.06.048.
- Auld, V J, R D Fetter, K Broadie, and C S Goodman. 1995. "Gliotactin, a Novel Transmembrane Protein on Peripheral Glia, Is Required to Form the Blood-nerve Barrier in *Drosophila*." *Cell* 81 (5) (June 2): 757–67.
- Auluck, Pavan K, Gabriela Caraveo, and Susan Lindquist. 2010. "α-Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (November 10): 211–33. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113313.
- Auluck, Pavan K, H Y Edwin Chan, John Q Trojanowski, Virginia M Y Lee, and Nancy M Bonini. 2002. "Chaperone Suppression of Alpha-synuclein Toxicity in a *Drosophila* Model for Parkinson's Disease." *Science (New York, N.Y.)* 295 (5556) (February 1): 865–8. doi:10.1126/science.1067389.
- Auluck, Pavan K, Marc C Meulener, and Nancy M Bonini. 2005. "Mechanisms of Suppression of {alpha}-Synuclein Neurotoxicity by Geldanamycin in *Drosophila*." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (4) (January 28): 2873–8. doi:10.1074/jbc.M412106200.
- Ayaz, Derya, Maarten Leyssen, Marta Koch, Jiekun Yan, Mohammed Srahna, Vasu Sheeba, Keri J Fogle, Todd C Holmes, and Bassem a Hassan. 2008. "Axonal Injury and Regeneration in the Adult Brain of *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (23) (June 4): 6010–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.0101-08.2008.
- Bae, Young-Joo, Kwang-Sook Park, and Soon-Ja Kang. 2003. "Genomic Organization and Expression of Parkin in *Drosophila Melanogaster*." *Experimental & Molecular Medicine* 35 (5) (October 31): 393–402.
- Bartel, David P. 2009. "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136 (2) (January 23): 215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Bartels, Tim, Joanna G Choi, and Dennis J Selkoe. 2011. "α-Synuclein Occurs Physiologically as a Helically Folded Tetramer That Resists Aggregation." *Nature* 477 (7362) (September 1): 107–10. doi:10.1038/nature10324.
- Bausenwein, B, N R Müller, and M Heisenberg. 1994. "Behavior-dependent Activity Labeling in the Central Complex of *Drosophila* During Controlled Visual Stimulation." *The Journal of Comparative Neurology* 340 (2) (February 8): 255–68. doi:10.1002/cne.903400210.
- Bayersdorfer, Florian, Aaron Voigt, Stephan Schneuwly, and José a Botella. 2010. "Dopamine-dependent Neurodegeneration in *Drosophila* Models of Familial and

- Sporadic Parkinson's Disease." *Neurobiology of Disease* 40 (1) (October): 113–9. doi:10.1016/j.nbd.2010.02.012.
- Beilina, Alexandra, Marcel Van Der Brug, Rili Ahmad, Sashi Kesavapany, David W Miller, Gregory A Petsko, and Mark R Cookson. 2005. "Mutations in PTEN-induced Putative Kinase 1 Associated with Recessive Parkinsonism Have Differential Effects on Protein Stability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (16) (April 19): 5703–8. doi:10.1073/pnas.0500617102.
- de Belle, J S, and M Heisenberg. 1994. "Associative Odor Learning in Drosophila Abolished by Chemical Ablation of Mushroom Bodies." *Science (New York, N.Y.)* 263 (5147) (February 4): 692–5.
- Benard, Giovanni, and Mariusz Karbowski. 2009. "Mitochondrial Fusion and Division: Regulation and Role in Cell Viability." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (3) (May): 365–74.
- Bender, Andreas, Kim J Krishnan, Christopher M Morris, Geoffrey A Taylor, Amy K Reeve, Robert H Perry, Evelyn Jaros, et al. 2006. "High Levels of Mitochondrial DNA Deletions in Substantia Nigra Neurons in Aging and Parkinson Disease." *Nature Genetics* 38 (5) (May): 515–7. doi:10.1038/ng1769.
- Beresford, P J, D Zhang, D Y Oh, Z Fan, E L Greer, M L Russo, M Jaju, and J Lieberman. 2001. "Granzyme A Activates an Endoplasmic Reticulum-associated Caspase-independent Nuclease to Induce Single-stranded DNA Nicks." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (46) (November 16): 43285–93. doi:10.1074/jbc.M108137200.
- Bergman, H, T Wichmann, and M R DeLong. 1990. "Reversal of Experimental Parkinsonism by Lesions of the Subthalamic Nucleus." *Science (New York, N.Y.)* 249 (4975) (September 21): 1436–8.
- Berry, Jacob A, Isaac Cervantes-Sandoval, Eric P Nicholas, and Ronald L Davis. 2012. "Dopamine Is Required for Learning and Forgetting in Drosophila." *Neuron* 74 (3) (May 10): 530–42. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.007.
- Betarbet, Ranjita, Todd B Sherer, Gillian Mackenzie, Monica Garcia-osuna, Alexander V Panov, and J Timothy Greenamyre. 2000. "Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features of Parkinson's Disease" 26: 1301–1306.
- Biernat, Jacek, Yong-Zhong Wu, Thomas Timm, Qingyi Zheng-Fischhöfer, Eckhard Mandelkow, Laurent Meijer, and Eva-Maria Mandelkow. 2002. "Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity." *Molecular Biology of the Cell* 13 (11) (November): 4013–28. doi:10.1091/mbc.02-03-0046.
- Bilen, Julide, and Nancy M Bonini. 2005. "Drosophila as a Model for Human Neurodegenerative Disease." *Annual Review of Genetics* 39 (January): 153–71. doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095804.

- . 2007. “Genome-wide Screen for Modifiers of Ataxin-3 Neurodegeneration in *Drosophila*.” *PLoS Genetics* 3 (10) (October): 1950–64. doi:10.1371/journal.pgen.0030177.
- Bilen, Julide, Nan Liu, Barrington G Burnett, Randall N Pittman, and Nancy M Bonini. 2006. “MicroRNA Pathways Modulate Polyglutamine-induced Neurodegeneration.” *Molecular Cell* 24 (1) (October 6): 157–63. doi:10.1016/j.molcel.2006.07.030.
- Birman, S, B Morgan, M Anzivino, and J Hirsh. 1994. “A Novel and Major Isoform of Tyrosine Hydroxylase in *Drosophila* Is Generated by Alternative RNA Processing.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (42) (October 21): 26559–67.
- Blackinton, Jeff, Mahadevan Lakshminarasimhan, Kelly J Thomas, Rili Ahmad, Elisa Greggio, Ashraf S Raza, Mark R Cookson, and Mark a Wilson. 2009. “Formation of a Stabilized Cysteine Sulfinic Acid Is Critical for the Mitochondrial Function of the Parkinsonism Protein DJ-1.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (10) (March 6): 6476–85. doi:10.1074/jbc.M806599200.
- Bohr, Vilhelm a. 2002. “Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA, and Some Changes with Aging in Mammalian Cells.” *Free Radical Biology & Medicine* 32 (9): 804–812.
- Boldin, M P, T M Goncharov, Y V Goltsev, and D Wallach. 1996. “Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-induced Cell Death.” *Cell* 85 (6) (June 14): 803–15.
- Boldogh, Istvan R, and Liza A Pon. 2007. “Mitochondria on the Move.” *Trends in Cell Biology* 17 (10) (October): 502–10. doi:10.1016/j.tcb.2007.07.008.
- Bonifati, V, P Rizzu, F Squitieri, E Krieger, N Vanacore, J C van Swieten, A Brice, et al. 2003. “DJ-1(PARK7), a Novel Gene for Autosomal Recessive, Early Onset Parkinsonism.” *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 24 (3) (October): 159–60. doi:10.1007/s10072-003-0108-0.
- Botella, Jose A, Florian Bayersdorfer, and Stephan Schneuwly. 2008. “Superoxide Dismutase Overexpression Protects Dopaminergic Neurons in a *Drosophila* Model of Parkinson’s Disease.” *Neurobiology of Disease* 30 (1) (April): 65–73. doi:10.1016/j.nbd.2007.11.013.
- Boveris, Alberto, Reiko Oshino, Maria Erecińska, and Britton Chance. 1971. “Reduction of Mitochondrial Components by Durohydroquinone.” *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 245 (1) (August): 1–16. doi:10.1016/0005-2728(71)90002-8.
- Braak, Heiko, Rob A I de Vos, Jürgen Bohl, and Kelly Del Tredici. 2006. “Gastric Alpha-synuclein Immunoreactive Inclusions in Meissner’s and Auerbach’s Plexuses in Cases Staged for Parkinson’s Disease-related Brain Pathology.” *Neuroscience Letters* 396 (1) (March 20): 67–72. doi:10.1016/j.neulet.2005.11.012.
- Branco, Joana, Ismael Al-Ramahi, Lubna Ukani, Alma M Pérez, Pedro Fernandez-Funez, Diego Rincón-Limas, and Juan Botas. 2008. “Comparative Analysis of Genetic Modifiers

- in *Drosophila* Points to Common and Distinct Mechanisms of Pathogenesis Among Polyglutamine Diseases.” *Human Molecular Genetics* 17 (3) (February 1): 376–90. doi:10.1093/hmg/ddm315.
- Brand, A H, and N Perrimon. 1993. “Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes.” *Development (Cambridge, England)* 118 (2) (June): 401–15.
- Brandt, Ronny, Yakun Xie, Thomas Musielak, Moritz Graeff, York-Dieter Stierhof, Hai Huang, Chun-Ming Liu, and Stephan Wenkel. 2012. “Control of Stem Cell Homeostasis via Interlocking microRNA and microProtein Feedback Loops.” *Mechanisms of Development* (July 7). doi:10.1016/j.mod.2012.06.007.
- Brown, David I, and Kathy K Griendling. 2009. “Nox Proteins in Signal Transduction.” *Free Radical Biology & Medicine* 47 (9) (November 1): 1239–53. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023.
- Budnik, V, and K White. 1988. “Catecholamine-containing Neurons in *Drosophila Melanogaster*: Distribution and Development.” *The Journal of Comparative Neurology* 268 (3) (February 15): 400–13. doi:10.1002/cne.902680309.
- Burré, Jacqueline, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark R Etherton, and Thomas C Südhof. 2010. “Alpha-synuclein Promotes SNARE-complex Assembly in Vivo and in Vitro.” *Science (New York, N.Y.)* 329 (5999) (September 24): 1663–7. doi:10.1126/science.1195227.
- Bus, J S, and J E Gibson. 1984. “Paraquat: Model for Oxidant-initiated Toxicity.” *Environmental Health Perspectives* 55 (April): 37–46.
- Bussell, Robert, and David Eliezer. 2004. “Effects of Parkinson’s Disease-linked Mutations on the Structure of Lipid-associated Alpha-synuclein.” *Biochemistry* 43 (16) (April 27): 4810–8. doi:10.1021/bi036135+.
- Böhm, H, V Brinkmann, M Drab, A Henske, and T V Kurzchalia. 1997. “Mammalian Homologues of *C. Elegans* PAR-1 Are Asymmetrically Localized in Epithelial Cells and May Influence Their Polarity.” *Current Biology : CB* 7 (8) (August 1): 603–6.
- Cabin, Deborah E, Kazuhiro Shimazu, Diane Murphy, Nelson B Cole, Wolfram Gottschalk, Kellie L McIlwain, Bonnie Orrison, et al. 2002. “Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking Alpha-synuclein.” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (20) (October 15): 8797–807.
- Calabrese, Vittorio, Eleonora Guagliano, Maria Sapienza, Mariangela Panebianco, Stella Calafato, Edoardo Puleo, Giovanni Pennisi, Cesare Mancuso, D Allan Butterfield, and Annamaria Giuffrida Stella. 2007. “Redox Regulation of Cellular Stress Response in Aging and Neurodegenerative Disorders: Role of Vitagenes.” *Neurochemical Research* 32 (4-5): 757–73. doi:10.1007/s11064-006-9203-y.
- Canet-Avilés, Rosa M, Mark A Wilson, David W Miller, Rili Ahmad, Chris McLendon, Sourav Bandyopadhyay, Melisa J Baptista, Dagmar Ringe, Gregory A Petsko, and Mark R

- Cookson. 2004. "The Parkinson's Disease Protein DJ-1 Is Neuroprotective Due to Cysteine-sulfinic Acid-driven Mitochondrial Localization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24) (June 15): 9103–8. doi:10.1073/pnas.0402959101.
- Carmine-Simmen, Katia, Thomas Proctor, Jakob Tschäpe, Burkhard Poeck, Tilman Triphan, Roland Strauss, and Doris Kretzschmar. 2009. "Neurotoxic Effects Induced by the Drosophila Amyloid-beta Peptide Suggest a Conserved Toxic Function." *Neurobiology of Disease* 33 (2) (February): 274–81. doi:10.1016/j.nbd.2008.10.014.
- Carron, R, V Fraix, C Maineri, E Seigneuret, B Piallat, P Krack, P Pollak, A L Benabid, and Stéphan Chabardès. 2011. "High Frequency Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus Versus Continuous Subcutaneous Apomorphine Infusion Therapy: a Review." *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 118 (6) (June): 915–24. doi:10.1007/s00702-010-0556-7.
- Castoldi, Mirco, and Martina U Muckenthaler. 2012. "Regulation of Iron Homeostasis by microRNAs." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* (June 9). doi:10.1007/s00018-012-1031-4.
- Cattaert, Daniel, Serge Birman, and De Bordeaux. 2001. "Blockade of the Central Generator of Locomotor Rhythm by Noncompetitive NMDA Receptor Antagonists in Drosophila Larvae ABSTRACT :." 58–73.
- Cha, Guang-Ho, Sunhong Kim, Jeehye Park, Eunji Lee, Myungjin Kim, Sung Bae Lee, Jin Man Kim, Jongkyeong Chung, and Kyoung Sang Cho. 2005. "Parkin Negatively Regulates JNK Pathway in the Dopaminergic Neurons of Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29) (July 19): 10345–50. doi:10.1073/pnas.0500346102.
- Chandra, Sreeranga, Gilbert Gallardo, Rafael Fernández-Chacón, Oliver M Schlüter, and Thomas C Südhof. 2005. "Alpha-synuclein Cooperates with CSPalpha in Preventing Neurodegeneration." *Cell* 123 (3) (November 4): 383–96. doi:10.1016/j.cell.2005.09.028.
- Chaudhuri, Anathbandhu, Kevin Bowling, Christopher Funderburk, Hakeem Lawal, Arati Inamdar, Zhe Wang, and Janis M O'Donnell. 2007. "Interaction of Genetic and Environmental Factors in a Drosophila Parkinsonism Model." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (10) (March 7): 2457–67. doi:10.1523/JNEUROSCI.4239-06.2007.
- Chen, Kuo-Hsin, Ping-Chia Li, Wei-Hsiang Lin, Chiang-Ting Chien, and Boon-Hua Low. 2011. "Depression by a Green Tea Extract of Alcohol-induced Oxidative Stress and Lipogenesis in Rat Liver." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (9) (January): 1668–76.
- Chen, Li, and Mel B Feany. 2005. "Alpha-synuclein Phosphorylation Controls Neurotoxicity and Inclusion Formation in a Drosophila Model of Parkinson Disease." *Nature Neuroscience* 8 (5) (May): 657–63. doi:10.1038/nn1443.
- Chen, R C, S F Chang, C L Su, M F Yen, H M Wu, Z Y Chen, and H H Liou. 2001. "Prevalence, Incidence, and Mortality of PD" (1): 1679–1686.

- Chiong, M, V Parra, V Eisner, C Ibarra, C Maldonado, A Criollo, R Bravo, et al. 2010. "Parallel Activation of Ca(2+)-induced Survival and Death Pathways in Cardiomyocytes by Sorbitol-induced Hyperosmotic Stress." *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death* 15 (8) (August): 887–903. doi:10.1007/s10495-010-0505-9.
- Choi, Dong-Hee, Ana Clara Cristóvão, Subhrangshu Guhathakurta, Jongmin Lee, Tong H Joh, M Flint Beal, and Yoon-Seong Kim. 2012. "NADPH Oxidase 1-mediated Oxidative Stress Leads to Dopamine Neuron Death in Parkinson's Disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 16 (10) (May 15): 1033–45. doi:10.1089/ars.2011.3960.
- Choong, Chi-Jing, and Yee-How Say. 2011. "Neuroprotection of A-synuclein Under Acute and Chronic Rotenone and Maneb Treatment Is Abolished by Its Familial Parkinson's Disease Mutations A30P, A53T and E46K." *Neurotoxicology* 32 (6) (December): 857–63. doi:10.1016/j.neuro.2011.05.012.
- Claridge-Chang, Adam, Robert D Roorda, Eleftheria Vrontou, Lucas Sjulson, Haiyan Li, Jay Hirsh, and Gero Miesenböck. 2009. "Writing Memories with Light-addressable Reinforcement Circuitry." *Cell* 139 (2) (October 16): 405–15. doi:10.1016/j.cell.2009.08.034.
- Clark, Ira E, Mark W Dodson, Changan Jiang, Joseph H Cao, Jun R Huh, Jae Hong Seol, Soon Ji Yoo, Bruce A Hay, and Ming Guo. 2006. "Drosophila Pink1 Is Required for Mitochondrial Function and Interacts Genetically with Parkin." *Nature* 441 (7097) (June 29): 1162–6. doi:10.1038/nature04779.
- Clark, L N, B M Ross, Y Wang, H Mejia-Santana, J Harris, E D Louis, L J Cote, et al. 2007. "Mutations in the Glucocerebrosidase Gene Are Associated with Early-onset Parkinson Disease." *Neurology* 69 (12) (September 18): 1270–7. doi:10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02.
- Clayton, D F, and J M George. 1998. "The Synucleins: a Family of Proteins Involved in Synaptic Function, Plasticity, Neurodegeneration and Disease." *Trends in Neurosciences* 21 (6) (June): 249–54.
- Cohen, Jonathan E, Philip R Lee, Shan Chen, Wei Li, and R Douglas Fields. 2011. "MicroRNA Regulation of Homeostatic Synaptic Plasticity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (28) (July 12): 11650–5. doi:10.1073/pnas.1017576108.
- Collins, Catherine A, and Aaron DiAntonio. 2007. "Synaptic Development: Insights from Drosophila." *Current Opinion in Neurobiology* 17 (1) (February): 35–42. doi:10.1016/j.conb.2007.01.001.
- Connolly, J B, I J Roberts, J D Armstrong, K Kaiser, M Forte, T Tully, and C J O'Kane. 1996. "Associative Learning Disrupted by Impaired Gs Signaling in Drosophila Mushroom Bodies." *Science (New York, N.Y.)* 274 (5295) (December 20): 2104–7.
- Conway, K A, J D Harper, and P T Lansbury. 1998. "Accelerated in Vitro Fibril Formation by a Mutant Alpha-synuclein Linked to Early-onset Parkinson Disease." *Nature Medicine* 4 (11) (November): 1318–20. doi:10.1038/3311.

- Cooper, Antony A, Aaron D Gitler, Anil Cashikar, Cole M Haynes, Kathryn J Hill, Bhupinder Bhullar, Kangning Liu, et al. 2006. "Alpha-synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models." *Science (New York, N.Y.)* 313 (5785) (July 21): 324–8. doi:10.1126/science.1129462.
- Corti, Olga, and Alexis Brice. 2007. "Of Parkin and Parkinson's: Light and Dark Sides of a Multifaceted E3 Ubiquitin–protein Ligase." *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 4 (2) (June): 121–127. doi:10.1016/j.ddmec.2007.11.002.
- Corti, Olga, Suzanne Lesage, and Alexis Brice. 2011. "What Genetics Tells Us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease." *Physiological Reviews* 91 (4) (October): 1161–218. doi:10.1152/physrev.00022.2010.
- Cory, Suzanne, and Jerry M Adams. 2002. "The Bcl2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-death Switch." *Nature Reviews. Cancer* 2 (9) (September): 647–56. doi:10.1038/nrc883.
- da Costa, C A, K Ancolio, and F Checler. 2000. "Wild-type but Not Parkinson's Disease-related Ala-53 --> Thr Mutant Alpha -synuclein Protects Neuronal Cells from Apoptotic Stimuli." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (31) (August 4): 24065–9. doi:10.1074/jbc.M002413200.
- da Costa, Cristine Alves, and Frederic Checler. 2010. "A Novel Parkin-mediated Transcriptional Function Links P53 to Familial Parkinson's Disease." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (1) (January 1): 16–7.
- da Costa, Cristine Alves, Claire Sunyach, Emilie Giaime, Andrew West, Olga Corti, Alexis Brice, Stephen Safe, et al. 2009. "Transcriptional Repression of P53 by Parkin and Impairment by Mutations Associated with Autosomal Recessive Juvenile Parkinson's Disease." *Nature Cell Biology* 11 (11) (November): 1370–5. doi:10.1038/ncb1981.
- Coulom, Hélène, and Serge Birman. 2004. "Chronic Exposure to Rotenone Models Sporadic Parkinson's Disease in Drosophila Melanogaster." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (48) (December 1): 10993–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004.
- Craig William. 2012. "Mitochondrial Disorders." Ed. Lee-Jun C. Wong, Ph.D. 837: 3–15. doi:10.1007/978-1-61779-504-6.
- Crist ov ao, Ana Clara, Dong-Hee Choi, Graça Baltazar, M Flint Beal, and Yoon-Seong Kim. 2009. "The Role of NADPH Oxidase 1-derived Reactive Oxygen Species in Paraquat-mediated Dopaminergic Cell Death." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (9) (September): 2105–18. doi:10.1089/ARS.2009.2459.
- Cross, Donna J, Jennifer a Flexman, Yoshimi Anzai, Kenneth R Maravilla, and Satoshi Minoshima. 2008. "Age-related Decrease in Axonal Transport Measured by MR Imaging in Vivo." *NeuroImage* 39 (3) (February 1): 915–26. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.08.036.
- Cui, Mei, Xiangna Tang, Whitney V Christian, Yisang Yoon, and Kim Tieu. 2010. "Perturbations in Mitochondrial Dynamics Induced by Human Mutant PINK1 Can Be

- Rescued by the Mitochondrial Division Inhibitor Mdivi-1." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (15) (April 9): 11740–52. doi:10.1074/jbc.M109.066662.
- Dagda, Ruben K, Salvatore J Cherra, Scott M Kulich, Anurag Tandon, David Park, and Charleen T Chu. 2009. "Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy Through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (20) (May 15): 13843–55. doi:10.1074/jbc.M808515200.
- Daniels, Richard W, Maria V Gelfand, Catherine a Collins, and Aaron DiAntonio. 2008. "Visualizing Glutamatergic Cell Bodies and Synapses in Drosophila Larval and Adult CNS." *The Journal of Comparative Neurology* 508 (1) (May 1): 131–52. doi:10.1002/cne.21670.
- Darios, Frédéric, Olga Corti, Christoph B Lücking, Cornelia Hampe, Marie-Paule Muriel, Nacer Abbas, Wen-Jie Gu, et al. 2003. "Parkin Prevents Mitochondrial Swelling and Cytochrome c Release in Mitochondria-dependent Cell Death." *Human Molecular Genetics* 12 (5) (March 1): 517–26.
- Das, Abhijit, Albert Chiang, Sejal Davla, Rashi Priya, Heinrich Reichert, K Vijayraghavan, and Veronica Rodrigues. 2011. "Identification and Analysis of a Glutamatergic Local Interneuron Lineage in the Adult Drosophila Olfactory System." *Neural Systems & Circuits* 1 (1) (January): 4. doi:10.1186/2042-1001-1-4.
- DePaolo, John, Ozlem Goker-Alpan, Ted Samaddar, Grisel Lopez, and Ellen Sidransky. 2009. "The Association Between Mutations in the Lysosomal Protein Glucocerebrosidase and Parkinsonism." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 24 (11) (August 15): 1571–8. doi:10.1002/mds.22538.
- Deas, Emma, Helene Plun-Favreau, and Nicholas W Wood. 2009. "PINK1 Function in Health and Disease." *EMBO Molecular Medicine* 1 (3) (June): 152–65. doi:10.1002/emmm.200900024.
- Dehay, Benjamin, Alfredo Ramirez, Marta Martinez-Vicente, Celine Perier, Marie-Hélène Carron, Evelyne Doudnikoff, Anne Vital, Miquel Vila, Christine Klein, and Erwan Bezard. 2012. "Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 Function Induces General Lysosomal Deficiency and Leads to Parkinson Disease Neurodegeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24) (June 12): 9611–6. doi:10.1073/pnas.1112368109.
- Deng, Hansong, Mark W Dodson, Haixia Huang, and Ming Guo. 2008. "The Parkinson's Disease Genes Pink1 and Parkin Promote Mitochondrial Fission And/or Inhibit Fusion in Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (38) (September 23): 14503–8. doi:10.1073/pnas.0803998105.
- Detmer, Scott A, and David C Chan. 2007. "Complementation Between Mouse Mfn1 and Mfn2 Protects Mitochondrial Fusion Defects Caused by CMT2A Disease Mutations." *The Journal of Cell Biology* 176 (4) (February 12): 405–14. doi:10.1083/jcb.200611080.
- Devine, Michael J, Katrina Gwinn, Andrew Singleton, and John Hardy. 2011. "Parkinson's Disease and A-synuclein Expression." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 26 (12) (October): 2160–8. doi:10.1002/mds.23948.

- Dexter, D T, F R Wells, A J Lees, F Agid, Y Agid, P Jenner, and C D Marsden. 1989. "Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease." *Journal of Neurochemistry* 52 (6) (June): 1830–6.
- Dhillon, Amanpreet S, G Lester Tarbutton, Jeffrey L Levin, George M Plotkin, Larry K Lowry, J Torey Nalbene, and Sara Shepherd. 2008. "Pesticide/environmental Exposures and Parkinson's Disease in East Texas." *Journal of Agromedicine* 13 (1) (January): 37–48. doi:10.1080/10599240801986215.
- Ding, Hongliu, Alison K Sarokhan, Sarah S Roderick, Rachit Bakshi, Nancy E Maher, Paymon Ashourian, Caroline G Kan, et al. 2011. "Association of SNCA with Parkinson: Replication in the Harvard NeuroDiscovery Center Biomarker Study." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 26 (12) (October): 2283–6. doi:10.1002/mds.23934.
- Dinis-Oliveira, R J, J A Duarte, A Sánchez-Navarro, F Remião, M L Bastos, and F Carvalho. 2008. "Paraquat Poisonings: Mechanisms of Lung Toxicity, Clinical Features, and Treatment." *Critical Reviews in Toxicology* 38 (1) (January): 13–71. doi:10.1080/10408440701669959.
- Dinis-Oliveira, R J, F Remião, H Carmo, J a Duarte, a Sánchez Navarro, M L Bastos, and F Carvalho. 2006. "Paraquat Exposure as an Etiological Factor of Parkinson's Disease." *Neurotoxicology* 27 (6) (December): 1110–22. doi:10.1016/j.neuro.2006.05.012.
- Djuranovic, Sergej, Ali Nahvi, and Rachel Green. 2011. "A Parsimonious Model for Gene Regulation by miRNAs." *Science (New York, N.Y.)* 331 (6017) (February 4): 550–3. doi:10.1126/science.1191138.
- Douzery, Emmanuel J P, Elizabeth A Snell, Eric Baptiste, Frédéric Delsuc, and Hervé Philippe. 2004. "The Timing of Eukaryotic Evolution: Does a Relaxed Molecular Clock Reconcile Proteins and Fossils?" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (43) (October 26): 15386–91. doi:10.1073/pnas.0403984101.
- Drago, J, P Padungchaichot, D Accili, and S Fuchs. 1998. "Dopamine Receptors and Dopamine Transporter in Brain Function and Addictive Behaviors: Insights from Targeted Mouse Mutants." *Developmental Neuroscience* 20 (2-3) (January): 188–203.
- Draper, Isabelle, Peri T Kurshan, Edward McBride, F Rob Jackson, and Alan S Kopin. 2007. "Locomotor Activity Is Regulated by D2-like Receptors in Drosophila: An Anatomic and Functional Analysis." *Developmental Neurobiology* 67 (3) (February 15): 378–93. doi:10.1002/dneu.20355.
- Drechsel, Derek A, and Manisha Patel. 2008. "Role of Reactive Oxygen Species in the Neurotoxicity of Environmental Agents Implicated in Parkinson's Disease." *Free Radical Biology & Medicine* 44 (11) (June 1): 1873–86. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.008.
- Drewes, G, A Ebneith, U Preuss, E M Mandelkow, and E Mandelkow. 1997. "MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption." *Cell* 89 (2) (April 18): 297–308.

- Drolet, Robert E, Jason R Cannon, Laura Montero, and J Timothy Greenamyre. 2009. "Chronic Rotenone Exposure Reproduces Parkinson's Disease Gastrointestinal Neuropathology." *Neurobiology of Disease* 36 (1) (October): 96–102. doi:10.1016/j.nbd.2009.06.017.
- Du, C, M Fang, Y Li, L Li, and X Wang. 2000. "Smac, a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome C-dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition." *Cell* 102 (1) (July 7): 33–42.
- Dubnau, J, L Grady, T Kitamoto, and T Tully. 2001. "Disruption of Neurotransmission in Drosophila Mushroom Body Blocks Retrieval but Not Acquisition of Memory." *Nature* 411 (6836) (May 24): 476–80. doi:10.1038/35078077.
- Eblan, Michael J, Jamie M Walker, and Ellen Sidransky. 2005. "The Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews." *The New England Journal of Medicine* 352 (7) (February 17): 728–31; author reply 728–31. doi:10.1056/NEJM200502173520719.
- El-Agnaf, O M, R Jakes, M D Curran, and A Wallace. 1998. "Effects of the Mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the Physical and Morphological Properties of Alpha-synuclein Protein Implicated in Parkinson's Disease." *FEBS Letters* 440 (1-2) (November 27): 67–70.
- Exner, Nicole, Anne Kathrin Lutz, Christian Haass, and Konstanze F Winklhofer. 2012. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Consequences." *The EMBO Journal* 31 (14) (July 18): 3038–62. doi:10.1038/emboj.2012.170.
- Exner, Nicole, Bettina Treske, Dominik Paquet, Kira Holmström, Carola Schiesling, Suzana Gispert, Iria Carballo-Carbajal, et al. 2007. "Loss-of-function of Human PINK1 Results in Mitochondrial Pathology and Can Be Rescued by Parkin." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (45) (November 7): 12413–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007.
- Fan, Zusen, Paul J Beresford, David Y Oh, Dong Zhang, and Judy Lieberman. 2003. "Tumor Suppressor NM23-H1 Is a Granzyme A-activated DNase During CTL-mediated Apoptosis, and the Nucleosome Assembly Protein SET Is Its Inhibitor." *Cell* 112 (5) (March 7): 659–72.
- Feany, Mel B, and Welcome W Bender. 2000. "A Drosophila Model of Parkinson's Disease" 404 (March).
- Feng, Guoping, Frances Hannan, Peter D Evans, Linda M Hall, and Yuen Yi Hon. 1996. "Cloning and Functional Characterization Receptor from Drosophila Melanogaster of a Novel Dopamine" 16 (12): 3925–3933.
- Feng, Guoping, Frances Hannan, Peter D Evans, Linda M Hall, Yuen Yi Hon, V Reale, and C T Kousky. 1996. "Cloning and Functional Characterization of a Novel Dopamine Receptor from Drosophila Melanogaster." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (12) (June 15): 3925–33.

- Fernandez-Funez, P, M L Nino-Rosales, B de Gouyon, W C She, J M Luchak, P Martinez, E Turiegano, et al. 2000. "Identification of Genes That Modify Ataxin-1-induced Neurodegeneration." *Nature* 408 (6808) (November 2): 101–6. doi:10.1038/35040584.
- Finelli, Alyce, Anju Kelkar, Ho-Juhn Song, Haidi Yang, and Mary Konsolaki. 2004. "A Model for Studying Alzheimer's Abeta42-induced Toxicity in *Drosophila Melanogaster*." *Molecular and Cellular Neurosciences* 26 (3) (July): 365–75. doi:10.1016/j.mcn.2004.03.001.
- Finkel, Toren. 2011. "Signal Transduction by Reactive Oxygen Species." *The Journal of Cell Biology* 194 (1) (July 11): 7–15. doi:10.1083/jcb.201102095.
- Fleckenstein, A, J Janke, H J Döring, and O Leder. 1974. "Myocardial Fiber Necrosis Due to Intracellular Ca Overload-a New Principle in Cardiac Pathophysiology." *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism* 4 (January): 563–80.
- Fortin, Doris L, Venu M Nemani, Susan M Voglmaier, Malcolm D Anthony, Timothy A Ryan, and Robert H Edwards. 2005. "Neural Activity Controls the Synaptic Accumulation of Alpha-synuclein." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (47) (November 23): 10913–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.2922-05.2005.
- Frederick, Rebecca L, and Janet M Shaw. 2007. "Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (12) (December): 1668–75. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00644.x.
- Freeman, Marc R, and Johnna Doherty. 2006. "Glial Cell Biology in *Drosophila* and Vertebrates." *Trends in Neurosciences* 29 (2) (February): 82–90. doi:10.1016/j.tins.2005.12.002.
- Friggi-Grelín, Florence, Magali Iché, and Serge Birman. 2003. "Tissue-specific Developmental Requirements of *Drosophila* Tyrosine Hydroxylase Isoforms." *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 35 (4) (April): 260–9. doi:10.1002/gene.1082.
- Fuchs, J, C Nilsson, J Kachergus, M Munz, E-M Larsson, B Schüle, J W Langston, et al. 2007. "Phenotypic Variation in a Large Swedish Pedigree Due to SNCA Duplication and Triplication." *Neurology* 68 (12) (March 20): 916–22. doi:10.1212/01.wnl.0000254458.17630.c5.
- Gan-Or, Z, N Giladi, U Rozovski, C Shifrin, S Rosner, T Gurevich, A Bar-Shira, and A Orr-Urtreger. 2008. "Genotype-phenotype Correlations Between GBA Mutations and Parkinson Disease Risk and Onset." *Neurology* 70 (24) (June 10): 2277–83. doi:10.1212/01.wnl.0000304039.11891.29.
- Gandhi, Malay S, German Kamalov, Atta U Shahbaz, Syamal K Bhattacharya, Robert A Ahokas, Yao Sun, Ivan C Gerling, and Karl T Weber. 2011. "Cellular and Molecular Pathways to Myocardial Necrosis and Replacement Fibrosis." *Heart Failure Reviews* 16 (1) (January): 23–34. doi:10.1007/s10741-010-9169-3.

- Ganguly-Fitzgerald, Indrani, Jeff Donlea, and Paul J Shaw. 2006. "Waking Experience Affects Sleep Need in *Drosophila*." *Science (New York, N.Y.)* 313 (5794) (September 22): 1775–81. doi:10.1126/science.1130408.
- Gehrke, Stephan, Yuzuru Imai, Nicholas Sokol, and Bingwei Lu. 2010. "Pathogenic LRRK2 Negatively Regulates microRNA-mediated Translational Repression." *Nature* 466 (7306) (July 29): 637–41. doi:10.1038/nature09191.
- Gervasi, Nicolas, Paul Tchénio, and Thomas Preat. 2010. "PKA Dynamics in a *Drosophila* Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase." *Neuron* 65 (4) (February 25): 516–29. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.014.
- Giasson, B I, I V Murray, J Q Trojanowski, and V M Lee. 2001. "A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of Alpha-synuclein Is Essential for Filament Assembly." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (4) (January 26): 2380–6. doi:10.1074/jbc.M008919200.
- Gibbs, S M, and J W Truman. 1998. "Nitric Oxide and Cyclic GMP Regulate Retinal Patterning in the Optic Lobe of *Drosophila*." *Neuron* 20 (1) (January): 83–93.
- Glimcher, L H. 2010. "XBP1: The Last Two Decades." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 Suppl 1 (January): i67–71. doi:10.1136/ard.2009.119388.
- Goedert, M, R Jakes, R A Crowther, J Six, U Lübke, M Vandermeeren, P Cras, J Q Trojanowski, and V M Lee. 1993. "The Abnormal Phosphorylation of Tau Protein at Ser-202 in Alzheimer Disease Recapitulates Phosphorylation During Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (11) (June 1): 5066–70.
- Goker-Alpan, O, R Schiffmann, M E LaMarca, R L Nussbaum, A McInerney-Leo, and E Sidransky. 2004. "Parkinsonism Among Gaucher Disease Carriers." *Journal of Medical Genetics* 41 (12) (December 1): 937–40. doi:10.1136/jmg.2004.024455.
- Greenberg, S G, and P Davies. 1990. "A Preparation of Alzheimer Paired Helical Filaments That Displays Distinct Tau Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (15) (August): 5827–31.
- Greene, James G, Ali Reza Noorian, and Shanthi Srinivasan. 2009. "Delayed Gastric Emptying and Enteric Nervous System Dysfunction in the Rotenone Model of Parkinson's Disease." *Experimental Neurology* 218 (1) (July): 154–61. doi:10.1016/j.expneurol.2009.04.023.
- Greene, Jessica C, Alexander J Whitworth, Laurie A Andrews, Tracey J Parker, and Leo J Pallanck. 2005. "Genetic and Genomic Studies of *Drosophila* Parkin Mutants Implicate Oxidative Stress and Innate Immune Responses in Pathogenesis." *Human Molecular Genetics* 14 (6) (March 15): 799–811. doi:10.1093/hmg/ddi074.
- Greene, Jessica C, Alexander J Whitworth, Isabella Kuo, Laurie A Andrews, Mel B Feany, and Leo J Pallanck. 2003. "Mitochondrial Pathology and Apoptotic Muscle Degeneration

- in *Drosophila* Parkin Mutants.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7) (April 1): 4078–83. doi:10.1073/pnas.0737556100.
- Greggio, Elisa, and Mark R Cookson. 2009. “Leucine-rich Repeat Kinase 2 Mutations and Parkinson’s Disease: Three Questions.” *ASN Neuro* 1 (1) (January). doi:10.1042/AN20090007.
- Greggio, Elisa, Shushant Jain, Ann Kingsbury, Rina Bandopadhyay, Patrick Lewis, Alice Kaganovich, Marcel P van der Brug, et al. 2006. “Kinase Activity Is Required for the Toxic Effects of Mutant LRRK2/dardarin.” *Neurobiology of Disease* 23 (2) (August): 329–41. doi:10.1016/j.nbd.2006.04.001.
- Greten-Harrison, Becket, Manuela Polydoro, Megumi Morimoto-Tomita, Ling Diao, Andrew M Williams, Esther H Nie, Sachin Makani, et al. 2010. “ $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein Triple Knockout Mice Reveal Age-dependent Neuronal Dysfunction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (45) (November 9): 19573–8. doi:10.1073/pnas.1005005107.
- Grundke-Iqbal, I, K Iqbal, Y C Tung, M Quinlan, H M Wisniewski, and L I Binder. 1986. “Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-associated Protein Tau (tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13) (July): 4913–7.
- Gu, Huaiyu, and Diane K O’Dowd. 2006. “Cholinergic Synaptic Transmission in Adult *Drosophila* Kenyon Cells in Situ.” *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (1) (January 4): 265–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.4109-05.2006.
- Gwinn, Katrina, Michael J Devine, Lee-Way Jin, Janel Johnson, Thomas Bird, Manfred Muentner, Cheryl Waters, et al. 2011. “Clinical Features, with Video Documentation, of the Original Familial Lewy Body Parkinsonism Caused by A-synuclein Triplication (Iowa Kindred).” *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 26 (11) (September): 2134–6. doi:10.1002/mds.23776.
- Gyls, Karen Hoppens, Jeffrey A Fein, Fusheng Yang, Dorothy J Wiley, Carol A Miller, and Gregory M Cole. 2004. “Synaptic Changes in Alzheimer’s Disease: Increased Amyloid-beta and Gliosis in Surviving Terminals Is Accompanied by Decreased PSD-95 Fluorescence.” *The American Journal of Pathology* 165 (5) (November): 1809–17.
- Haass, Christian. 2010. “Initiation and Propagation of Neurodegeneration.” *Nature Medicine* 16 (11) (November): 1201–4. doi:10.1038/nm.2223.
- Hampe, Cornelia, Hector Ardila-Osorio, Margot Fournier, Alexis Brice, and Olga Corti. 2006. “Biochemical Analysis of Parkinson’s Disease-causing Variants of Parkin, an E3 Ubiquitin-protein Ligase with Monoubiquitylation Capacity.” *Human Molecular Genetics* 15 (13) (July 1): 2059–75. doi:10.1093/hmg/ddl131.
- Han, K a, N S Millar, M S Grotewiel, and R L Davis. 1996. “DAMB, a Novel Dopamine Receptor Expressed Specifically in *Drosophila* Mushroom Bodies.” *Neuron* 16 (6) (June): 1127–35.

- Hancock, Dana B, Eden R Martin, Gregory M Mayhew, Jeffrey M Stajich, Rita Jewett, Mark A Stacy, Burton L Scott, Jeffery M Vance, and William K Scott. 2008. "Pesticide Exposure and Risk of Parkinson's Disease: a Family-based Case-control Study." *BMC Neurology* 8 (1) (January): 6. doi:10.1186/1471-2377-8-6.
- Hartenstein, Volker. 2011. "Morphological Diversity and Development of Glia in *Drosophila*." *Glia* 59 (9) (September): 1237–52. doi:10.1002/glia.21162.
- Healy, Daniel G, Mario Falchi, Sean S O'Sullivan, Vincenzo Bonifati, Alexandra Durr, Susan Bressman, Alexis Brice, et al. 2008. "Phenotype, Genotype, and Worldwide Genetic Penetrance of LRRK2-associated Parkinson's Disease: a Case-control Study." *Lancet Neurology* 7 (7) (July): 583–90. doi:10.1016/S1474-4422(08)70117-0.
- Hearn, Mark G, Yong Ren, Edward W McBride, Isabelle Reveillaud, Martin Beinborn, and Alan S Kopin. 2002. "A *Drosophila* Dopamine 2-like Receptor: Molecular Characterization and Identification of Multiple Alternatively Spliced Variants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22) (October 29): 14554–9. doi:10.1073/pnas.202498299.
- Hegde, Ramesh, Srinivasa M Srinivasula, ZhiJia Zhang, Richard Wassell, Rula Mukattash, Lucia Cilenti, Garrett DuBois, et al. 2002. "Identification of Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-caspase Interaction." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (1) (January 4): 432–8. doi:10.1074/jbc.M109721200.
- Heikkila, R E, W J Nicklas, I Vyas, and R C Duvoisin. 1985. "Dopaminergic Toxicity of Rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium Ion After Their Stereotaxic Administration to Rats: Implication for the Mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Toxicity." *Neuroscience Letters* 62 (3) (December 18): 389–94.
- Heisenberg, M, A Borst, S Wagner, and D Byers. 1985. "*Drosophila* Mushroom Body Mutants Are Deficient in Olfactory Learning." *Journal of Neurogenetics* 2 (1) (February): 1–30.
- Helfrich-Förster, Charlotte, Michael N Nitabach, and Todd C Holmes. 2011. "Insect Circadian Clock Outputs." *Essays in Biochemistry* 49 (1) (June 30): 87–101. doi:10.1042/bse0490087.
- Helfrich-Förster, Charlotte, Jörg Wulf, and J Steven de Belle. 2002. "Mushroom Body Influence on Locomotor Activity and Circadian Rhythms in *Drosophila Melanogaster*." *Journal of Neurogenetics* 16 (2): 73–109.
- Henchcliffe, Claire, and M Flint Beal. 2008. "Mitochondrial Biology and Oxidative Stress in Parkinson Disease Pathogenesis." *Nature Clinical Practice. Neurology* 4 (11) (November): 600–9. doi:10.1038/ncpneuro0924.
- Hinkle, P C, R A Butow, E Racker, and B Chance. 1967. "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. XV. Reverse Electron Transfer in the Flavin-cytochrome Beta Region of the Respiratory Chain of Beef Heart Submitochondrial Particles." *The Journal of Biological Chemistry* 242 (22) (November 25): 5169–73.

- Hirsh, J, and N Davidson. 1981. "Isolation and Characterization of the Dopa Decarboxylase Gene of *Drosophila Melanogaster*." *Molecular and Cellular Biology* 1 (6) (June): 475–85.
- Hirsh, Jay, Thomas Riemensperger, Hélène Coulom, Magali Ich  , Jamie Coupar, and Serge Birman. 2010. "Roles of Dopamine in Circadian Rhythmicity and Extreme Light Sensitivity of Circadian Entrainment." *Current Biology : CB* 20 (3) (February 9): 209–14. doi:10.1016/j.cub.2009.11.037.
- Hirth, Frank. 2010. "Drosophila Melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration." *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 9 (4) (August): 504–23.
- Hopkins, T L, and K J Kramer. 1992. "Insect Cuticle Sclerotization." *Annual Review of Entomology* 37 (1) (January 28): 273–302. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.001421.
- Horowitz, T S, B E Cade, J M Wolfe, and C A Czeisler. 2001. "Efficacy of Bright Light and Sleep/darkness Scheduling in Alleviating Circadian Maladaptation to Night Work." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 281 (2) (August): E384–91.
- Hruska, Kathleen S, Mary E LaMarca, C Ronald Scott, and Ellen Sidransky. 2008. "Gaucher Disease: Mutation and Polymorphism Spectrum in the Glucocerebrosidase Gene (GBA)." *Human Mutation* 29 (5) (May): 567–83. doi:10.1002/humu.20676.
- Hwang, Dong-Youn, Paul Ardayfio, Un Jung Kang, Elena V Semina, and Kwang-Soo Kim. 2003. "Selective Loss of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra of Pitx3-deficient Aphakia Mice." *Brain Research. Molecular Brain Research* 114 (2) (June 10): 123–31.
- Ibáñez, Pablo, Suzanne Lesage, Sabine Janin, Ebba Lohmann, Frank Durif, Alain Dest  e, Anne-Marie Bonnet, et al. 2009. "Alpha-synuclein Gene Rearrangements in Dominantly Inherited Parkinsonism: Frequency, Phenotype, and Mechanisms." *Archives of Neurology* 66 (1) (January): 102–8. doi:10.1001/archneurol.2008.555.
- Iijima, Koichi, Hsin-Ping Liu, Ann-Shyn Chiang, Stephen A Hearn, Mary Konsolaki, and Yi Zhong. 2004. "Dissecting the Pathological Effects of Human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a Potential Model for Alzheimer's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17) (April 27): 6623–8. doi:10.1073/pnas.0400895101.
- Iijima-Ando, Kanae, Stephen A Hearn, Linda Granger, Christopher Shenton, Anthony Gatt, Hsueh-Cheng Chiang, Inessa Hakker, Yi Zhong, and Koichi Iijima. 2008. "Overexpression of Neprilysin Reduces Alzheimer Amyloid-beta42 (Abeta42)-induced Neuron Loss and Intraneuronal Abeta42 Deposits but Causes a Reduction in cAMP-responsive Element-binding Protein-mediated Transcription, Age-dependent Axon Pathology, and Prem." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (27) (July 4): 19066–76. doi:10.1074/jbc.M710509200.
- Ikeda, Yoshio, Randy S Daughters, and Laura P W Ranum. 2008. "Bidirectional Expression of the SCA8 Expansion Mutation: One Mutation, Two Genes." *Cerebellum (London, England)* 7 (2) (January): 150–8. doi:10.1007/s12311-008-0010-7.

- Ikeuchi, Takeshi, Akiyoshi Kakita, Atsushi Shiga, Kensaku Kasuga, Hiruyoyuki Kaneko, Chun-Feng Tan, Jiro Idezuka, et al. 2008. "Patients Homozygous and Heterozygous for SNCA Duplication in a Family with Parkinsonism and Dementia." *Archives of Neurology* 65 (4) (April): 514–9. doi:10.1001/archneur.65.4.514.
- Imai, Yuzuru, Stephan Gehrke, Hua-Qin Wang, Ryosuke Takahashi, Kazuko Hasegawa, Etsuro Oota, and Bingwei Lu. 2008. "Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 Affects the Maintenance of Dopaminergic Neurons in *Drosophila*." *The EMBO Journal* 27 (18) (September 17): 2432–43. doi:10.1038/emboj.2008.163.
- Infanger, David W, Ram V Sharma, and Robin L Davisson. "NADPH Oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function." *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (9-10): 1583–96. doi:10.1089/ars.2006.8.1583.
- Isabel, Guillaume, Alberto Pascual, and Thomas Preat. 2004. "Exclusive Consolidated Memory Phases in *Drosophila*." *Science (New York, N.Y.)* 304 (5673) (May 14): 1024–7. doi:10.1126/science.1094932.
- Ito, K, J Urban, and G M Technau. 1995. "Distribution , Classification , and Development of *Drosophila* Glial Cells in the Late Embryonic and Early Larval Ventral Nerve Cord." *Roux's Arch Dev Biol*; 284–307.
- Ja, William W, Gil B Carvalho, Elizabeth M Mak, Noelle N de la Rosa, Annie Y Fang, Jonathan C Liong, Ted Brummel, and Seymour Benzer. 2007. "Prandiology of *Drosophila* and the CAFE Assay." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (20) (May 15): 8253–6. doi:10.1073/pnas.0702726104.
- Jackson, G R, I Salecker, X Dong, X Yao, N Arnheim, P W Faber, M E MacDonald, and S L Zipursky. 1998. "Polyglutamine-expanded Human Huntingtin Transgenes Induce Degeneration of *Drosophila* Photoreceptor Neurons." *Neuron* 21 (3) (September): 633–42.
- Jackson, George R, Martina Wiedau-Pazos, Tzu-Kang Sang, Naveed Wagle, Carlos A Brown, Sasan Massachi, and Daniel H Geschwind. 2002. "Human Wild-type Tau Interacts with Wingless Pathway Components and Produces Neurofibrillary Pathology in *Drosophila*." *Neuron* 34 (4) (May 16): 509–19.
- Jagdeo, Jared, and Neil Brody. 2011. "Complementary Antioxidant Function of Caffeine and Green Tea Polyphenols in Normal Human Skin Fibroblasts." *Journal of Drugs in Dermatology : JDD* 10 (7) (July): 753–61.
- Jan, L Y, and Y N Jan. 1976. "L-glutamate as an Excitatory Transmitter at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction." *The Journal of Physiology* 262 (1) (October): 215–36.
- Janetzky, B, S Hauck, M B Youdim, P Riederer, K Jellinger, F Pantucek, R Zöchling, K W Boissl, and H Reichmann. 1994. "Unaltered Aconitase Activity, but Decreased Complex I Activity in Substantia Nigra Pars Compacta of Patients with Parkinson's Disease." *Neuroscience Letters* 169 (1-2) (March 14): 126–8.
- Jenner, Peter. 2003. "Oxidative Stress in Parkinson's Disease." *Annals of Neurology* 53 Suppl 3 (January): S26–36; discussion S36–8. doi:10.1002/ana.10483.

- Jensen, P H, M S Nielsen, R Jakes, C G Dotti, and M Goedert. 1998. "Binding of Alpha-synuclein to Brain Vesicles Is Abolished by Familial Parkinson's Disease Mutation." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41) (October 9): 26292–4.
- Jin, Huajun, Arthi Kanthasamy, Anamitra Ghosh, Yongjie Yang, Vellareddy Anantharam, and Anumantha G Kanthasamy. 2011. "α-Synuclein Negatively Regulates Protein Kinase Cδ Expression to Suppress Apoptosis in Dopaminergic Neurons by Reducing P300 Histone Acetyltransferase Activity." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (6) (February 9): 2035–51. doi:10.1523/JNEUROSCI.5634-10.2011.
- John, George B, Yonglei Shang, Li Li, Christian Renken, Carmen A Mannella, Jeanne M L Selker, Linda Rangell, Michael J Bennett, and Jiping Zha. 2005. "The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology." *Molecular Biology of the Cell* 16 (3) (March): 1543–54. doi:10.1091/mbc.E04-08-0697.
- Joiner, M A, and L C Griffith. 2000. "Visual Input Regulates Circuit Configuration in Courtship Conditioning of *Drosophila Melanogaster*." *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 7 (1) (January): 32–42.
- Jones, Melanie A, Julia Warner Gargano, Devin Rhodenizer, Ian Martin, Poonam Bhandari, and Mike Grotewiel. 2009. "A Forward Genetic Screen in *Drosophila* Implicates Insulin Signaling in Age-related Locomotor Impairment." *Experimental Gerontology* 44 (8) (August): 532–40. doi:10.1016/j.exger.2009.05.007.
- Junn, Eunsung, and M Maral Mouradian. 2012. "MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Their Therapeutic Potential." *Pharmacology & Therapeutics* 133 (2) (February): 142–50. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.10.002.
- Kahle, Philipp J. 2008. "alpha-Synucleinopathy Models and Human Neuropathology: Similarities and Differences." *Acta Neuropathologica* 115 (1) (January): 87–95. doi:10.1007/s00401-007-0302-x.
- Kahsai, L, M a Carlsson, a M E Winther, and D R Nässel. 2012. "Distribution of Metabotropic Receptors of Serotonin, Dopamine, GABA, Glutamate, and Short Neuropeptide F in the Central Complex of *Drosophila*." *Neuroscience* 208 (February 11): 11–26. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.02.007.
- Karsten, Stanislav L, Tzu-Kang Sang, Lauren T Gehman, Shreyasi Chatterjee, Jiankai Liu, George M Lawless, Soma Sengupta, et al. 2006. "A Genomic Screen for Modifiers of Tauopathy Identifies Puromycin-sensitive Aminopeptidase as an Inhibitor of Tau-induced Neurodegeneration." *Neuron* 51 (5) (September 7): 549–60. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.019.
- Keane, P C, M Kurzawa, P G Blain, and C M Morris. 2011. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Parkinson's Disease* 2011 (January): 716871. doi:10.4061/2011/716871.
- Kelley, Brendan J, Andrew P Duker, and Peter Chiu. 2012. "Dopamine Agonists and Pathologic Behaviors." *Parkinson's Disease* 2012 (January): 603631. doi:10.1155/2012/603631.

- Kerr, J F, A H Wyllie, and A R Currie. 1972. "Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4) (August): 239–57.
- Kim, Jongpil, Keiichi Inoue, Jennifer Ishii, William B Vanti, Sergey V Voronov, Elizabeth Murchison, Gregory Hannon, and Asa Abeliovich. 2007. "A MicroRNA Feedback Circuit in Midbrain Dopamine Neurons." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5842) (August 31): 1220–4. doi:10.1126/science.1140481.
- Kim, V Narry, Jinju Han, and Mikiko C Siomi. 2009. "Biogenesis of Small RNAs in Animals." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (2) (February): 126–39. doi:10.1038/nrm2632.
- Kim, Young-Cho, Hyun-Gwan Lee, and Kyung-An Han. 2007. "D1 Dopamine Receptor dDA1 Is Required in the Mushroom Body Neurons for Aversive and Appetitive Learning in *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (29) (July 18): 7640–7. doi:10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007.
- Kim, Young-Cho, Hyun-Gwan Lee, Chang-Soo Seong, and Kyung-An Han. 2003. "Expression of a D1 Dopamine Receptor dDA1/DmDOP1 in the Central Nervous System of *Drosophila Melanogaster*." *Gene Expression Patterns* 3 (2) (May): 237–245. doi:10.1016/S1567-133X(02)00098-4.
- Klement, I A, P J Skinner, M D Kaytor, H Yi, S M Hersch, H B Clark, H Y Zoghbi, and H T Orr. 1998. "Ataxin-1 Nuclear Localization and Aggregation: Role in Polyglutamine-induced Disease in SCA1 Transgenic Mice." *Cell* 95 (1) (October 2): 41–53.
- Kleniewska, Paulina, Aleksandra Piechota, Beata Skibska, and Anna Gorąca. 2012. "The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors." *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 60 (4) (August): 277–94. doi:10.1007/s00005-012-0176-z.
- Klivenyi, Peter, Donald Siwek, Gabrielle Gardian, Lichuan Yang, Anatoly Starkov, Carine Cleren, Robert J Ferrante, Neil W Kowall, Asa Abeliovich, and M Flint Beal. 2006. "Mice Lacking Alpha-synuclein Are Resistant to Mitochondrial Toxins." *Neurobiology of Disease* 21 (3) (March): 541–8. doi:10.1016/j.nbd.2005.08.018.
- Knight, David, Konstantin Iliadi, Milton P Charlton, Harold L Atwood, and Gabrielle L Boulianne. 2007. "Presynaptic Plasticity and Associative Learning Are Impaired in a *Drosophila* Presenilin Null Mutant." *Developmental Neurobiology* 67 (12) (October): 1598–613. doi:10.1002/dneu.20532.
- Kobayashi, Michie, Ikuko Ohura, Kazuhito Kawakita, Naohiko Yokota, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto, Noriyuki Doke, and Hirofumi Yoshioka. 2007. "Calcium-dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase." *The Plant Cell* 19 (3) (March): 1065–80. doi:10.1105/tpc.106.048884.
- Koh, Y H, L S Gramates, and V Budnik. 2000. "Drosophila Larval Neuromuscular Junction: Molecular Components and Mechanisms Underlying Synaptic Plasticity." *Microscopy Research and Technique* 49 (1) (April 1): 14–25. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(20000401)49:1<14::AID-JEMT3>3.0.CO;2-G.

- Krashes, Michael J, Shamik DasGupta, Andrew Vreede, Benjamin White, J Douglas Armstrong, and Scott Waddell. 2009. "A Neural Circuit Mechanism Integrating Motivational State with Memory Expression in *Drosophila*." *Cell* 139 (2) (October 16): 416–27. doi:10.1016/j.cell.2009.08.035.
- Kraytsberg, Yevgenya, Elena Kudryavtseva, Ann C McKee, Changiz Geula, Neil W Kowall, and Konstantin Khrapko. 2006. "Mitochondrial DNA Deletions Are Abundant and Cause Functional Impairment in Aged Human Substantia Nigra Neurons." *Nature Genetics* 38 (5) (May): 518–20. doi:10.1038/ng1778.
- Kretzschmar, Doris. 2005. "Neurodegenerative Mutants in *Drosophila*: a Means to Identify Genes and Mechanisms Involved in Human Diseases?" *Invertebrate Neuroscience : IN* 5 (3-4) (November): 97–109.
- Kretzschmar, Doris, Jakob Tschäpe, Alexandre Bettencourt Da Cruz, Esther Asan, Burkhard Poeck, Roland Strauss, and Gert O Pflugfelder. 2005. "Glial and Neuronal Expression of Polyglutamine Proteins Induce Behavioral Changes and Aggregate Formation in *Drosophila*." *Glia* 49 (1) (January 1): 59–72. doi:10.1002/glia.20098.
- Krüger, R, W Kuhn, T Müller, D Voitalla, M Graeber, S Kösel, H Przuntek, J T Epplen, L Schöls, and O Riess. 1998. "Ala30Pro Mutation in the Gene Encoding Alpha-synuclein in Parkinson's Disease." *Nature Genetics* 18 (2) (February): 106–8. doi:10.1038/ng0298-106.
- Kume, Kazuhiko, Shoen Kume, Sang Ki Park, Jay Hirsh, and F Rob Jackson. 2005. "Dopamine Is a Regulator of Arousal in the Fruit Fly." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (32) (August 10): 7377–84. doi:10.1523/JNEUROSCI.2048-05.2005.
- Langston, J W, I Irwin, E B Langston, and L S Forno. 1984. "1-Methyl-4-phenylpyridinium Ion (MPP+): Identification of a Metabolite of MPTP, a Toxin Selective to the Substantia Nigra." *Neuroscience Letters* 48 (1) (July 13): 87–92.
- Larsen, Kristin E, Yvonne Schmitz, Matthew D Troyer, Eugene Mosharov, Paula Dietrich, Abrar Z Quazi, Magali Savalle, et al. 2006. "Alpha-synuclein Overexpression in PC12 and Chromaffin Cells Impairs Catecholamine Release by Interfering with a Late Step in Exocytosis." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (46) (November 15): 11915–22. doi:10.1523/JNEUROSCI.3821-06.2006.
- Lassus, Patrice, Ximena Opitz-Araya, and Yuri Lazebnik. 2002. "Requirement for Caspase-2 in Stress-induced Apoptosis Before Mitochondrial Permeabilization." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5585) (August 23): 1352–4. doi:10.1126/science.1074721.
- Lavara-Culebras, Eusebio, and Nuria Paricio. 2007. "*Drosophila* DJ-1 Mutants Are Sensitive to Oxidative Stress and Show Reduced Lifespan and Motor Deficits." *Gene* 400 (1-2) (October 1): 158–65. doi:10.1016/j.gene.2007.06.013.
- Lawal, Hakeem O, Hui-Yun Chang, Ashley N Terrell, Elizabeth S Brooks, Dianne Pulido, Anne F Simon, and David E Krantz. 2010. "The *Drosophila* Vesicular Monoamine

- Transporter Reduces Pesticide-induced Loss of Dopaminergic Neurons." *Neurobiology of Disease* 40 (1) (October): 102–12. doi:10.1016/j.nbd.2010.05.008.
- Lebestky, Tim, Jung-Sook C Chang, Heiko Dankert, Lihi Zelnik, Young-Cho Kim, Kyung-An Han, Fred W Wolf, Pietro Perona, and David J Anderson. 2009. "Two Different Forms of Arousal in *Drosophila* Are Oppositely Regulated by the Dopamine D1 Receptor Ortholog DopR via Distinct Neural Circuits." *Neuron* 64 (4) (November 25): 522–36. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.031.
- Lee, R C, R L Feinbaum, and V Ambros. 1993. "The *C. Elegans* Heterochronic Gene *Lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*." *Cell* 75 (5) (December 3): 843–54.
- Lee, Sung Bae, Wonho Kim, Sungkyu Lee, and Jongkyeong Chung. 2007. "Loss of LRRK2/PARK8 Induces Degeneration of Dopaminergic Neurons in *Drosophila*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358 (2) (June 29): 534–9. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.156.
- Lee, V M, M Goedert, and J Q Trojanowski. 2001. "Neurodegenerative Tauopathies." *Annual Review of Neuroscience* 24 (January): 1121–59. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1121.
- Leiserson, W M, E W Harkins, and H Keshishian. 2000. "Fray, a *Drosophila* Serine/threonine Kinase Homologous to Mammalian PASK, Is Required for Axonal Ensheathment." *Neuron* 28 (3) (December): 793–806.
- Leonard, J P, and M M Salpeter. 1979. "Agonist-induced Myopathy at the Neuromuscular Junction Is Mediated by Calcium." *The Journal of Cell Biology* 82 (3) (September): 811–9.
- Leung, Anthony K L, and Phillip A Sharp. 2010. "MicroRNA Functions in Stress Responses." *Molecular Cell* 40 (2) (October 22): 205–15. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.027.
- Li, Airong, Zhongcong Xie, Yuanlin Dong, Kenneth M McKay, Mary L McKee, and Rudolph E Tanzi. 2007. "Isolation and Characterization of the *Drosophila* Ubiquilin Ortholog dUbqln: In Vivo Interaction with Early-onset Alzheimer Disease Genes." *Human Molecular Genetics* 16 (21) (November 1): 2626–39. doi:10.1093/hmg/ddm219.
- Li, L Y, X Luo, and X Wang. 2001. "Endonuclease G Is an Apoptotic DNase When Released from Mitochondria." *Nature* 412 (6842) (July 5): 95–9. doi:10.1038/35083620.
- Li, P, D Nijhawan, I Budihardjo, S M Srinivasula, M Ahmad, E S Alnemri, and X Wang. 1997. "Cytochrome c and dATP-dependent Formation of Apaf-1/caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade." *Cell* 91 (4) (November 14): 479–89.
- Lima, Susana Q, and Gero Miesenböck. 2005. "Remote Control of Behavior Through Genetically Targeted Photostimulation of Neurons." *Cell* 121 (1) (April 8): 141–52. doi:10.1016/j.cell.2005.02.004.
- Liou, H H, M C Tsai, C J Chen, J S Jeng, Y C Chang, S Y Chen, and R C Chen. 1997. "Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease." (7): 141–146.

- Liu, Nan, Michael Landreh, Kajia Cao, Masashi Abe, Gert-Jan Hendriks, Jason R Kennerdell, Yongqing Zhu, Li-San Wang, and Nancy M Bonini. 2012. "The microRNA miR-34 Modulates Ageing and Neurodegeneration in *Drosophila*." *Nature* 482 (7386) (February 23): 519–23. doi:10.1038/nature10810.
- Liu, Song, Tomoyo Sawada, Seongsoo Lee, Wendou Yu, George Silverio, Philomena Alapatt, Ivan Millan, et al. 2012. "Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria." *PLoS Genetics* 8 (3) (March): e1002537. doi:10.1371/journal.pgen.1002537.
- Liu, Zhaohui, Xiaoyue Wang, Yi Yu, Xueping Li, Tao Wang, Haibing Jiang, Qiuting Ren, et al. 2008. "A *Drosophila* Model for LRRK2-linked Parkinsonism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7) (February 19): 2693–8. doi:10.1073/pnas.0708452105.
- Liévens, Jean-Charles, and Serge Birman. 2007. "Les Astrocytes Dans La Chorée De Huntington." *Médecine/Sciences* 18: 845–849.
- Liévens, Jean-Charles, Magali Iché, Monique Laval, Catherine Faivre-Sarrailh, and Serge Birman. 2008. "AKT-sensitive or Insensitive Pathways of Toxicity in Glial Cells and Neurons in *Drosophila* Models of Huntington's Disease." *Human Molecular Genetics* 17 (6) (March 15): 882–94. doi:10.1093/hmg/ddm360.
- Liévens, Jean-Charles, Thomas Rival, Magali Iché, Hervé Chneiweiss, and Serge Birman. 2005. "Expanded Polyglutamine Peptides Disrupt EGF Receptor Signaling and Glutamate Transporter Expression in *Drosophila*." *Human Molecular Genetics* 14 (5) (March 1): 713–24. doi:10.1093/hmg/ddi067.
- Lu, Yi Wei, and Eng-King Tan. 2008. "Molecular Biology Changes Associated with LRRK2 Mutations in Parkinson's Disease." *Journal of Neuroscience Research* 86 (9) (July): 1895–901. doi:10.1002/jnr.21656.
- Lundblad, Martin, Mickael Decressac, Bengt Mattsson, and Anders Björklund. 2012. "Impaired Neurotransmission Caused by Overexpression of A-synuclein in Nigral Dopamine Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9) (February 28): 3213–9. doi:10.1073/pnas.1200575109.
- Luo, L, T Tully, and K White. 1992. "Human Amyloid Precursor Protein Ameliorates Behavioral Deficit of Flies Deleted for *App1* Gene." *Neuron* 9 (4) (October): 595–605.
- Lutz, A Kathrin, Nicole Exner, Mareike E Fett, Julia S Schlehe, Karina Kloos, Kerstin Lämmermann, Bettina Brunner, et al. 2009. "Loss of Parkin or PINK1 Function Increases Drp1-dependent Mitochondrial Fragmentation." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (34) (August 21): 22938–51. doi:10.1074/jbc.M109.035774.
- Lwin, Alicia, Eduard Orvisky, Ozlem Goker-Alpan, Mary E LaMarca, and Ellen Sidransky. 2004. "Glucocerebrosidase Mutations in Subjects with Parkinsonism." *Molecular Genetics and Metabolism* 81 (1) (January): 70–3.
- Mao, Zhengmei, and Ronald L Davis. 2009. "Eight Different Types of Dopaminergic Neurons Innervate the *Drosophila* Mushroom Body Neuropil: Anatomical and Physiological

- Heterogeneity." *Frontiers in Neural Circuits* 3 (January): 5. doi:10.3389/neuro.04.005.2009.
- Marciniak, Stefan J, and David Ron. 2006. "Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Disease." *Physiological Reviews* 86 (4) (October): 1133–49. doi:10.1152/physrev.00015.2006.
- Marella, Sunanda, Kevin Mann, and Kristin Scott. 2012. "Dopaminergic Modulation of Sucrose Acceptance Behavior in *Drosophila*." *Neuron* 73 (5) (March 8): 941–50. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.032.
- Markey, S P, J N Johannessen, C C Chiueh, R S Burns, and M A Herkenham. 1985. "Intraneuronal Generation of a Pyridinium Metabolite May Cause Drug-induced Parkinsonism." *Nature* 311 (5985): 464–7.
- Maroteaux, L, J T Campanelli, and R H Scheller. 1988. "Synuclein: a Neuron-specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 8 (8) (August): 2804–15.
- Martin, J R, R Ernst, and M Heisenberg. 1998. "Mushroom Bodies Suppress Locomotor Activity in *Drosophila Melanogaster*." *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 5 (1-2): 179–91.
- Martin, Lee J. 2012. "Biology of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 107 (January): 355–415. doi:10.1016/B978-0-12-385883-2.00005-9.
- Martinat, Cecile, Jean-Jacques Bacci, Thomas Leete, Jongpil Kim, William B Vanti, Amy H Newman, Joo H Cha, Ulrik Gether, Honggang Wang, and Asa Abeliovich. 2006. "Cooperative Transcription Activation by Nurr1 and Pitx3 Induces Embryonic Stem Cell Maturation to the Midbrain Dopamine Neuron Phenotype." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8) (February 21): 2874–9. doi:10.1073/pnas.0511153103.
- Martinez-Vicente, Marta, Zsolt Talloczy, Susmita Kaushik, Ashish C Massey, Joseph Mazzulli, Eugene V Mosharov, Roberto Hodara, et al. 2008. "Dopamine-modified Alpha-synuclein Blocks Chaperone-mediated Autophagy." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2) (February): 777–88. doi:10.1172/JCI32806.
- Matsuda, Noriyuki, Toshiaki Kitami, Toshiaki Suzuki, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori, and Keiji Tanaka. 2006. "Diverse Effects of Pathogenic Mutations of Parkin That Catalyze Multiple Monoubiquitylation in Vitro." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (6) (February 10): 3204–9. doi:10.1074/jbc.M510393200.
- Mawhinney, R M S, and B E Staveley. 2011. "Expression of GFP Can Influence Aging and Climbing Ability in *Drosophila*." *Genetics and Molecular Research: GMR* 10 (1) (January): 494–505. doi:10.4238/vol10-1gmr1023.
- McBride, S M, G Giuliani, C Choi, P Krause, D Correale, K Watson, G Baker, and K K Siwicki. 1999. "Mushroom Body Ablation Impairs Short-term Memory and Long-term Memory of

- Courtship Conditioning in *Drosophila Melanogaster*." *Neuron* 24 (4) (December): 967–77.
- McGuire, S E, P T Le, and R L Davis. 2001. "The Role of *Drosophila* Mushroom Body Signaling in Olfactory Memory." *Science (New York, N.Y.)* 293 (5533) (August 17): 1330–3. doi:10.1126/science.1062622.
- Meng, Zhuo-Xian, Guo-Xiao Wang, and Jiandie D Lin. 2012. "A MicroRNA Circuitry Links Macrophage Polarization to Metabolic Homeostasis." *Circulation* 125 (23) (June 12): 2815–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.111518.
- Menzies, Fiona M, Sarat C Yeniseti, and Kyung-Tai Min. 2005. "Roles of *Drosophila* DJ-1 in Survival of Dopaminergic Neurons and Oxidative Stress." *Current Biology: CB* 15 (17) (September 6): 1578–82. doi:10.1016/j.cub.2005.07.036.
- Mershin, Andreas, Elias Pavlopoulos, Olivia Fitch, Brittany C Braden, Dimitri V Nanopoulos, and Efthimios M C Skoulakis. 2004. "Learning and Memory Deficits Upon TAU Accumulation in *Drosophila* Mushroom Body Neurons." *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 11 (3): 277–87. doi:10.1101/lm.70804.
- Meulener, Marc, Alexander J Whitworth, Cecilia E Armstrong-Gold, Patrizia Rizzu, Peter Heutink, Paul D Wes, Leo J Pallanck, and Nancy M Bonini. 2005. "*Drosophila* DJ-1 Mutants Are Selectively Sensitive to Environmental Toxins Associated with Parkinson's Disease." *Current Biology: CB* 15 (17) (September 6): 1572–7. doi:10.1016/j.cub.2005.07.064.
- Meunier, Nicolas, Yesser Hadj Belgacem, and Jean-René Martin. 2007. "Regulation of Feeding Behaviour and Locomotor Activity by Takeout in *Drosophila*." *The Journal of Experimental Biology* 210 (Pt 8) (April): 1424–34. doi:10.1242/jeb.02755.
- Miller, Anne-Frances. 2012. "Superoxide Dismutases: Ancient Enzymes and New Insights." *FEBS Letters* 586 (5) (March 9): 585–95. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.048.
- Miller, D W, S M Hague, J Clarimon, M Baptista, K Gwinn-Hardy, M R Cookson, and A B Singleton. 2004. "Alpha-synuclein in Blood and Brain from Familial Parkinson Disease with SNCA Locus Triplication." *Neurology* 62 (10) (May 25): 1835–8.
- Miller, David W, Rili Ahmad, Stephen Hague, Melisa J Baptista, Rosa Canet-Aviles, Chris McLendon, Donald M Carter, et al. 2003. "L166P Mutant DJ-1, Causative for Recessive Parkinson's Disease, Is Degraded Through the Ubiquitin-proteasome System." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38) (September 19): 36588–95. doi:10.1074/jbc.M304272200.
- Miska, Eric A, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Allison L Abbott, Nelson C Lau, Andrew B Hellman, Shannon M McGonagle, David P Bartel, Victor R Ambros, and H Robert Horvitz. 2007. "Most *Caenorhabditis Elegans* microRNAs Are Individually Not Essential for Development or Viability." *PLoS Genetics* 3 (12) (December): e215. doi:10.1371/journal.pgen.0030215.
- Missale, C, S R Nash, S W Robinson, M Jaber, and M G Caron. 1998. "Dopamine Receptors: From Structure to Function." *Physiological Reviews* 78 (1) (January): 189–225.

- Mittler, Ron. 2002. "Oxidative Stress , Antioxidants And" 7 (9): 405–410.
- Mittler, Ron, Sandy Vanderauwera, Nobuhiro Suzuki, Gad Miller, Vanesa B Tognetti, Klaas Vandepoele, Marty Gollery, Vladimir Shulaev, and Frank Van Breusegem. 2011. "ROS Signaling: The New Wave?" *Trends in Plant Science* 16 (6) (June): 300–9. doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007.
- Miñones-Moyano, Elena, Sílvia Porta, Georgia Escaramís, Raquel Rabionet, Susana Iraola, Birgit Kagerbauer, Yolanda Espinosa-Parrilla, Isidre Ferrer, Xavier Estivill, and Eulàlia Martí. 2011. "MicroRNA Profiling of Parkinson's Disease Brains Identifies Early Downregulation of miR-34b/c Which Modulate Mitochondrial Function." *Human Molecular Genetics* 20 (15) (August 1): 3067–78. doi:10.1093/hmg/ddr210.
- Monastiriotti, M. 1999. "Biogenic Amine Systems in the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster*." *Microscopy Research and Technique* 45 (2) (April 15): 106–21. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19990415)45:2<106::AID-JEMT5>3.0.CO;2-3.
- Moore, Darren J, Li Zhang, Ted M Dawson, and Valina L Dawson. 2003. "A Missense Mutation (L166P) in DJ-1, Linked to Familial Parkinson's Disease, Confers Reduced Protein Stability and Impairs Homo-oligomerization." *Journal of Neurochemistry* 87 (6) (December): 1558–67.
- Muenter, M D, L S Forno, O Hornykiewicz, S J Kish, D M Maraganore, R J Caselli, H Okazaki, F M Howard, B J Snow, and D B Calne. 1998. "Hereditary Form of Parkinsonism--dementia." *Annals of Neurology* 43 (6) (June): 768–81. doi:10.1002/ana.410430612.
- Murphy, D D, S M Rueter, J Q Trojanowski, and V M Lee. 2000. "Synucleins Are Developmentally Expressed, and Alpha-synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (9) (May 1): 3214–20.
- Muzio, M, A M Chinnaiyan, F C Kischkel, K O'Rourke, A Shevchenko, J Ni, C Scaffidi, et al. 1996. "FLICE, a Novel FADD-homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death--inducing Signaling Complex." *Cell* 85 (6) (June 14): 817–27.
- Nakamura, Ken, Venu M Nemani, Erika K Wallender, Katrin Kaehlcke, Melanie Ott, and Robert H Edwards. 2008. "Optical Reporters for the Conformation of Alpha-synuclein Reveal a Specific Interaction with Mitochondria." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (47) (November 19): 12305–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.3088-08.2008.
- Narhi, L, S J Wood, S Steavenson, Y Jiang, G M Wu, D Anafi, S A Kaufman, et al. 1999. "Both Familial Parkinson's Disease Mutations Accelerate Alpha-synuclein Aggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (14) (April 2): 9843–6.
- Neckameyer, W S, and W G Quinn. 1989. "Isolation and Characterization of the Gene for *Drosophila* Tyrosine Hydroxylase." *Neuron* 2 (2) (February): 1167–75.
- Neckameyer, W S, and K White. 1993. "Drosophila Tyrosine Hydroxylase Is Encoded by the Pale Locus." *Journal of Neurogenetics* 8 (4) (April): 189–99.

- Nemani, Venu M, Wei Lu, Victoria Berge, Ken Nakamura, Bibiana Onoa, Michael K Lee, Farrukh A Chaudhry, Roger A Nicoll, and Robert H Edwards. 2010. "Increased Expression of Alpha-synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis." *Neuron* 65 (1) (January 14): 66–79. doi:10.1016/j.neuron.2009.12.023.
- Neudorfer, O, N Giladi, D Elstein, A Abrahamov, T Turezkite, E Aghai, A Reches, B Bembi, and A Zimran. 1996. "Occurrence of Parkinson's Syndrome in Type I Gaucher Disease." *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* 89 (9) (September): 691–4.
- Neuser, Kirska, Tilman Triphan, Markus Mronz, Burkhard Poeck, and Roland Strauss. 2008. "Analysis of a Spatial Orientation Memory in Drosophila." *Nature* 453 (7199) (June 26): 1244–7. doi:10.1038/nature07003.
- Neves, Fábio Fernandes, Romualdo Barroso Sousa, Antônio Pazin-Filho, Palmira Cupo, Jorge Elias Júnior, and Marcello Henrique Nogueira-Barbosa. "Severe Paraquat Poisoning: Clinical and Radiological Findings in a Survivor." *Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicação Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia e Tisiologia* 36 (4): 513–6.
- Ng, Chee-Hoe, Shaun Z S Mok, Cherlyn Koh, Xuezhi Ouyang, Marc L Fivaz, Eng-King Tan, Valina L Dawson, Ted M Dawson, Fengwei Yu, and Kah-Leong Lim. 2009. "Parkin Protects Against LRRK2 G2019S Mutant-induced Dopaminergic Neurodegeneration in Drosophila." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (36) (September 9): 11257–62. doi:10.1523/JNEUROSCI.2375-09.2009.
- Nishimura, Isao, Yufeng Yang, and Bingwei Lu. 2004. "PAR-1 Kinase Plays an Initiator Role in a Temporally Ordered Phosphorylation Process That Confers Tau Toxicity in Drosophila." *Cell* 116 (5) (March 5): 671–82.
- Nunes, Irene, Lucy T Tovmasian, Robert M Silva, Robert E Burke, and Stephen P Goff. 2003. "Pitx3 Is Required for Development of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7) (April 1): 4245–50. doi:10.1073/pnas.0230529100.
- Nuytemans, Karen, Jessie Theuns, Marc Cruts, and Christine Van Broeckhoven. 2010. "Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes: a Mutation Update." *Human Mutation* 31 (7) (July): 763–80. doi:10.1002/humu.21277.
- Nässel, D R, and K Elekes. 1992. "Aminergic Neurons in the Brain of Blowflies and Drosophila: Dopamine- and Tyrosine Hydroxylase-immunoreactive Neurons and Their Relationship with Putative Histaminergic Neurons." *Cell and Tissue Research* 267 (1) (January): 147–67.
- Ogasawara, Yoko, Hidetaka Kaya, Goro Hiraoka, Fumiaki Yumoto, Sachie Kimura, Yasuhiro Kadota, Haruka Hishinuma, et al. 2008. "Synergistic Activation of the Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (14) (April 4): 8885–92. doi:10.1074/jbc.M708106200.

- Ott, Martin, Vladimir Gogvadze, Sten Orrenius, and Boris Zhivotovsky. 2007. "Mitochondria, Oxidative Stress and Cell Death." *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death* 12 (5) (May): 913–22. doi:10.1007/s10495-007-0756-2.
- Outeiro, Tiago F, Jochen Klucken, Kathryn Bercury, Julie Tetzlaff, Preeti Putcha, Luis M A Oliveira, Alexandre Quintas, Pamela J McLean, and Bradley T Hyman. 2009. "Dopamine-induced Conformational Changes in Alpha-synuclein." *PloS One* 4 (9) (January): e6906. doi:10.1371/journal.pone.0006906.
- Pan-Montojo, Francisco, Oleg Anichtchik, Yanina Dening, Lilla Knels, Stefan Pursche, Roland Jung, Sandra Jackson, et al. 2010. "Progression of Parkinson's Disease Pathology Is Reproduced by Intragastric Administration of Rotenone in Mice." *PloS One* 5 (1) (January): e8762. doi:10.1371/journal.pone.0008762.
- Papatheodoropoulos, C, and G Kostopoulos. 1996. "Age-related Changes in Excitability and Recurrent Inhibition in the Rat CA1 Hippocampal Region." *The European Journal of Neuroscience* 8 (3) (March): 510–20.
- Park, Jeehye, Sung Yun Kim, Guang-Ho Cha, Sung Bae Lee, Sunhong Kim, and Jongkyeong Chung. 2005. "Drosophila DJ-1 Mutants Show Oxidative Stress-sensitive Locomotive Dysfunction." *Gene* 361 (December 21): 133–9. doi:10.1016/j.gene.2005.06.040.
- Park, Jeehye, Gina Lee, and Jongkyeong Chung. 2009. "The PINK1-Parkin Pathway Is Involved in the Regulation of Mitochondrial Remodeling Process." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (3) (January 16): 518–23. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.086.
- Park, Jeehye, Sung Bae Lee, Sungkyu Lee, Yongsung Kim, Saera Song, Sunhong Kim, Eunkyung Bae, et al. 2006. "Mitochondrial Dysfunction in Drosophila PINK1 Mutants Is Complemented by Parkin." *Nature* 441 (7097) (June 29): 1157–61. doi:10.1038/nature04788.
- Park, Soon S, and Daewoo Lee. 2006. "Selective Loss of Dopaminergic Neurons and Formation of Lewy Body-like Aggregations in Alpha-synuclein Transgenic Fly Neuronal Cultures." *The European Journal of Neuroscience* 23 (11) (June): 2908–14. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04844.x.
- Pereanu, Wayne, Diana Shy, and Volker Hartenstein. 2005. "Morphogenesis and Proliferation of the Larval Brain Glia in Drosophila." *Developmental Biology* 283 (1) (July 1): 191–203. doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.024.
- Pesah, Yakov, Heather Burgess, Brooke Middlebrooks, Kari Ronningen, Jude Prosser, Vijaya Tirunagaru, John Zysk, and Graeme Mardon. 2005. "Whole-mount Analysis Reveals Normal Numbers of Dopaminergic Neurons Following Misexpression of alpha-Synuclein in Drosophila." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 41 (4) (April): 154–9. doi:10.1002/gene.20106.
- Peternelj, Tina-Tinkara, and Jeff S Coombes. 2011. "Antioxidant Supplementation During Exercise Training: Beneficial or Detrimental?" *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 41 (12) (December 1): 1043–69. doi:10.2165/11594400-000000000-00000.

- Petrovitch, Helen, G Webster Ross, Robert D Abbott, Wayne T Sanderson, Dan S Sharp, Caroline M Tanner, Kamal H Masaki, et al. 2002. "Plantation Work and Risk of Parkinson Disease in a Population-based Longitudinal Study." *Archives of Neurology* 59 (11) (November): 1787–92.
- Plaçais, Pierre-Yves, Séverine Trannoy, Guillaume Isabel, Yoshinori Aso, Igor Siwanowicz, Ghislain Belliard-Guérin, Philippe Vernier, Serge Birman, Hiromu Tanimoto, and Thomas Preat. 2012. "Slow Oscillations in Two Pairs of Dopaminergic Neurons Gate Long-term Memory Formation in *Drosophila*." *Nature Neuroscience* 15 (4) (April): 592–9. doi:10.1038/nn.3055.
- Polymeropoulos, M H, J J Higgins, L I Golbe, W G Johnson, S E Ide, G Di Iorio, G Sanges, et al. 1996. "Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23." *Science (New York, N.Y.)* 274 (5290) (November 15): 1197–9.
- Poole, Angela C, Ruth E Thomas, Laurie A Andrews, Heidi M McBride, Alexander J Whitworth, and Leo J Pallanck. 2008. "The PINK1/Parkin Pathway Regulates Mitochondrial Morphology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5) (February 5): 1638–43. doi:10.1073/pnas.0709336105.
- Poorkaj, P, J G Nutt, D James, S Ganther, T D Bird, E Steinbart, G D Schellenberg, and Haydeh Payami. 2004. "Parkin Mutation Analysis in Clinic Patients with Early-onset Parkinson [corrected] Disease." *American Journal of Medical Genetics. Part A* 129A (1) (August 15): 44–50. doi:10.1002/ajmg.a.30157.
- Raghu, Shamprasad Varija, and Alexander Borst. 2011. "Candidate Glutamatergic Neurons in the Visual System of *Drosophila*." *PloS One* 6 (5) (January): e19472. doi:10.1371/journal.pone.0019472.
- Raichur, A, S Vali, and F Gorin. 2006. "Dynamic Modeling of Alpha-synuclein Aggregation for the Sporadic and Genetic Forms of Parkinson's Disease." *Neuroscience* 142 (3) (October 27): 859–70. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.06.052.
- Ramirez, Alfredo, André Heimbach, Jan Gründemann, Barbara Stiller, Dan Hampshire, L Pablo Cid, Ingrid Goebel, et al. 2006. "Hereditary Parkinsonism with Dementia Is Caused by Mutations in ATP13A2, Encoding a Lysosomal Type 5 P-type ATPase." *Nature Genetics* 38 (10) (October): 1184–91. doi:10.1038/ng1884.
- Rappold, Phillip M, Mei Cui, Adrienne S Chesser, Jacqueline Tibbett, Jonathan C Grima, Lihua Duan, Namita Sen, Jonathan A Javitch, and Kim Tieu. 2011. "Paraquat Neurotoxicity Is Mediated by the Dopamine Transporter and Organic Cation Transporter-3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (51) (December 20): 20766–71. doi:10.1073/pnas.1115141108.
- Rein, Karlheinz, Malte Zöckler, Michael T Mader, Cornelia Grübel, and Martin Heisenberg. 2002. "The *Drosophila* Standard Brain." *Current Biology : CB* 12 (3) (February 5): 227–31.
- Reinhart, B J, F J Slack, M Basson, A E Pasquinelli, J C Bettinger, A E Rougvie, H R Horvitz, and G Ruvkun. 2000. "The 21-nucleotide Let-7 RNA Regulates Developmental Timing

- in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 403 (6772) (February 24): 901–6. doi:10.1038/35002607.
- Rich, P R, and W D Bonner. 1978. "The Sites of Superoxide Anion Generation in Higher Plant Mitochondria." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 188 (1) (May): 206–13.
- Rickert, Christof, Thomas Kunz, Kerri-Lee Harris, Paul M Whittington, and Gerhard M Technau. 2011. "Morphological Characterization of the Entire Interneuron Population Reveals Principles of Neuromere Organization in the Ventral Nerve Cord of *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (44) (November 2): 15870–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.4009-11.2011.
- Riemensperger, Thomas, Guillaume Isabel, Hélène Coulom, Kirsa Neuser, Laurent Seugnet, and Kazuhiko Kume. 2011. "Behavioral Consequences of Dopamine Deficiency in the *Drosophila* Central Nervous System." *PNAS* 108 (2): 834–839. doi:10.1073/pnas.1010930108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010930108.
- Riemensperger, Thomas, Guillaume Isabel, Hélène Coulom, Kirsa Neuser, Laurent Seugnet, Kazuhiko Kume, Magali Ich e-Torres, et al. 2011. "Behavioral Consequences of Dopamine Deficiency in the *Drosophila* Central Nervous System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2) (January 11): 834–9. doi:10.1073/pnas.1010930108.
- Riemensperger, Thomas, Thomas V oller, Patrick Stock, Erich Buchner, and André Fiala. 2005. "Punishment Prediction by Dopaminergic Neurons in *Drosophila*." *Current Biology : CB* 15 (21) (November 8): 1953–60. doi:10.1016/j.cub.2005.09.042.
- Ristow, Michael, and Kim Zarse. 2010. "How Increased Oxidative Stress Promotes Longevity and Metabolic Health: The Concept of Mitochondrial Hormesis (mitohormesis)." *Experimental Gerontology* 45 (6) (June): 410–8. doi:10.1016/j.exger.2010.03.014.
- Ristow, Michael, Kim Zarse, Andreas Oberbach, Nora Kl otting, Marc Birringer, Michael Kiehnopf, Michael Stumvoll, C Ronald Kahn, and Matthias Bl uher. 2009. "Antioxidants Prevent Health-promoting Effects of Physical Exercise in Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (21) (May 26): 8665–70. doi:10.1073/pnas.0903485106.
- Rival, Thomas, Laurent Soustelle, Daniel Cattaert, Colette Strambi, Magali Ich e, and Serge Birman. 2006. "Physiological Requirement for the Glutamate Transporter dEAAT1 at the Adult *Drosophila* Neuromuscular Junction." *Journal of Neurobiology* 66 (10) (September 1): 1061–74. doi:10.1002/neu.20270.
- Rival, Thomas, Laurent Soustelle, Colette Strambi, Marie-Thérèse Besson, Magali Ich e, and Serge Birman. 2004. "Decreasing Glutamate Buffering Capacity Triggers Oxidative Stress and Neuropil Degeneration in the *Drosophila* Brain." *Current Biology : CB* 14 (7) (April 6): 599–605. doi:10.1016/j.cub.2004.03.039.
- Robertson, John D, Mari Enoksson, Minna Suomela, Boris Zhivotovsky, and Sten Orrenius. 2002. "Caspase-2 Acts Upstream of Mitochondria to Promote Cytochrome c Release

- During Etoposide-induced Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33) (August 16): 29803–9. doi:10.1074/jbc.M204185200.
- Ron, David, and Peter Walter. 2007. "Signal Integration in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7) (July): 519–29. doi:10.1038/nrm2199.
- Roselli, F, M Tirard, J Lu, P Hutzler, P Lamberti, P Livrea, M Morabito, and O F X Almeida. 2005. "Soluble Beta-amyloid1-40 Induces NMDA-dependent Degradation of Postsynaptic Density-95 at Glutamatergic Synapses." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (48) (November 30): 11061–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.3034-05.2005.
- Rossi, F, and M Zatti. 1964. "Biochemical Aspects of Phagocytosis in Polymorphonuclear Leucocytes. NADH and NADPH Oxidation by the Granules of Resting and Phagocytizing Cells." *Experientia* 20 (1) (January 15): 21–3.
- Rudenko, Iakov N, Alice Kaganovich, David N Hauser, Aleksandra Beylina, Ruth Chia, Jinhui Ding, Dragan Maric, Howard Jaffe, and Mark R Cookson. 2012. "The G2385R Variant of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Associated with Parkinson's Disease Is a Partial Loss of Function Mutation." *The Biochemical Journal* 446 (1) (May 22): 99–111. doi:10.1042/BJ20120637.
- Rutkowski, D Thomas, and Randal J Kaufman. 2004. "A Trip to the ER: Coping with Stress." *Trends in Cell Biology* 14 (1) (January): 20–8.
- Sandebring, Anna, Kelly Jean Thomas, Alexandra Beilina, Marcel van der Brug, Megan M Cleland, Rili Ahmad, David W Miller, et al. 2009. "Mitochondrial Alterations in PINK1 Deficient Cells Are Influenced by Calcineurin-dependent Dephosphorylation of Dynamin-related Protein 1." *PloS One* 4 (5) (January): e5701. doi:10.1371/journal.pone.0005701.
- Sang, Tzu-Kang, Hui-Yun Chang, George M Lawless, Anuradha Ratnaparkhi, Lisa Mee, Larry C Ackerson, Nigel T Maidment, David E Krantz, and George R Jackson. 2007. "A Drosophila Model of Mutant Human Parkin-induced Toxicity Demonstrates Selective Loss of Dopaminergic Neurons and Dependence on Cellular Dopamine." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (5) (January 31): 981–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.4810-06.2007.
- Satake, Wataru, Yuko Nakabayashi, Ikuko Mizuta, Yushi Hirota, Chiyomi Ito, Michiaki Kubo, Takahisa Kawaguchi, et al. 2009. "Genome-wide Association Study Identifies Common Variants at Four Loci as Genetic Risk Factors for Parkinson's Disease." *Nature Genetics* 41 (12) (December): 1303–7. doi:10.1038/ng.485.
- Saudou, F, S Finkbeiner, D Devys, and M E Greenberg. 1998. "Huntingtin Acts in the Nucleus to Induce Apoptosis but Death Does Not Correlate with the Formation of Intranuclear Inclusions." *Cell* 95 (1) (October 2): 55–66.
- Schanne, F A, A B Kane, E E Young, and J L Farber. 1979. "Calcium Dependence of Toxic Cell Death: a Final Common Pathway." *Science (New York, N.Y.)* 206 (4419) (November 9): 700–2.

- Schapira, Anthony H V. 2008. "Mitochondria in the Aetiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease." *Lancet Neurology* 7 (1) (January): 97–109. doi:10.1016/S1474-4422(07)70327-7.
- . 2011. "Mitochondrial Pathology in Parkinson's Disease." *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 78 (6): 872–81. doi:10.1002/msj.20303.
- Schapira, Anthony H V, and Matthew Gegg. 2011. "Mitochondrial Contribution to Parkinson's Disease Pathogenesis." *Parkinson's Disease* 2011 (January): 159160. doi:10.4061/2011/159160.
- Schmitz, I, H Walczak, P H Krammer, and M E Peter. 1999. "Differences Between CD95 Type I and II Cells Detected with the CD95 Ligand." *Cell Death and Differentiation* 6 (9) (September): 821–2. doi:10.1038/sj.cdd.4400569.
- Scholz, H, J Ramond, C M Singh, and U Heberlein. 2000. "Functional Ethanol Tolerance in *Drosophila*." *Neuron* 28 (1) (October): 261–71.
- Schuler, F, and J E Casida. 2001. "Functional Coupling of PSST and ND1 Subunits in NADH:ubiquinone Oxidoreductase Established by Photoaffinity Labeling." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1506 (1) (July 2): 79–87.
- Schwaerzel, Martin, Maria Monastirioti, Henrike Scholz, Florence Friggi-Grelin, Serge Birman, and Martin Heisenberg. 2003. "Dopamine and Octopamine Differentiate Between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (33) (November 19): 10495–502.
- Selcho, Mareike, Dennis Pauls, Kyung-An Han, Reinhard F Stocker, and Andreas S Thum. 2009. "The Role of Dopamine in *Drosophila* Larval Classical Olfactory Conditioning." *PLoS One* 4 (6) (January): e5897. doi:10.1371/journal.pone.0005897.
- Selkoe, Dennis J. 2001. "Alzheimer's Disease Results from the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid Beta-protein." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 3 (1) (February): 75–80.
- Serway, Christine N, Rebecca R Kaufman, Roland Strauss, and J Steven de Belle. 2009. "Mushroom Bodies Enhance Initial Motor Activity in *Drosophila*." *Journal of Neurogenetics* 23 (1-2) (January): 173–84. doi:10.1080/01677060802572895.
- Seugnet, Laurent, Yasuko Suzuki, Lucy Vine, Laura Gottschalk, and Paul J Shaw. 2008. "D1 Receptor Activation in the Mushroom Bodies Rescues Sleep-loss-induced Learning Impairments in *Drosophila*." *Current Biology : CB* 18 (15) (August 5): 1110–7. doi:10.1016/j.cub.2008.07.028.
- Shulman, Joshua M, Philip L De Jager, and Mel B Feany. 2011. "Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis." *Annual Review of Pathology* 6 (January): 193–222. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130242.
- Shulman, Joshua M, Lisa M Shulman, William J Weiner, and Mel B Feany. 2003. "From Fruit Fly to Bedside: Translating Lessons from *Drosophila* Models of Neurodegenerative

- Disease.” *Current Opinion in Neurology* 16 (4) (August): 443–9. doi:10.1097/01.wco.0000084220.82329.60.
- Sidhu, Anita, Christophe Wersinger, and Philippe Vernier. 2004. “Does Alpha-synuclein Modulate Dopaminergic Synaptic Content and Tone at the Synapse?” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (6) (April): 637–47. doi:10.1096/fj.03-1112rev.
- Sidransky, E, M a Nalls, J O Aasly, J Aharon-Peretz, G Annesi, E R Barbosa, a Bar-Shira, et al. 2009. “Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson’s Disease.” *The New England Journal of Medicine* 361 (17) (October 22): 1651–61. doi:10.1056/NEJMoa0901281.
- Simon, Anne F, Richard Daniels, Rafael Romero-Calderón, Anna Grygoruk, Hui-Yun Chang, Rod Najibi, David Shamouelian, et al. 2009. “Drosophila Vesicular Monoamine Transporter Mutants Can Adapt to Reduced or Eliminated Vesicular Stores of Dopamine and Serotonin.” *Genetics* 181 (2) (February): 525–41. doi:10.1534/genetics.108.094110.
- Simón-Sánchez, Javier, Claudia Schulte, Jose M Bras, Manu Sharma, J Raphael Gibbs, Daniela Berg, Coro Paisan-Ruiz, et al. 2009. “Genome-wide Association Study Reveals Genetic Risk Underlying Parkinson’s Disease.” *Nature Genetics* 41 (12) (December): 1308–12. doi:10.1038/ng.487.
- Smith, Wanli W, Zhong Pei, Haibing Jiang, Valina L Dawson, Ted M Dawson, and Christopher A Ross. 2006. “Kinase Activity of Mutant LRRK2 Mediates Neuronal Toxicity.” *Nature Neuroscience* 9 (10) (October): 1231–3. doi:10.1038/nn1776.
- Soubannier, Vincent, and Heidi M McBride. 2009. “Positioning Mitochondrial Plasticity Within Cellular Signaling Cascades.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (1) (January): 154–70. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.008.
- Spillantini, M G, M L Schmidt, V M Lee, J Q Trojanowski, R Jakes, and M Goedert. 1997. “Alpha-synuclein in Lewy Bodies.” *Nature* 388 (6645) (August 28): 839–40. doi:10.1038/42166.
- Srinivasula, S M, R Hegde, A Saleh, P Datta, E Shiozaki, J Chai, R A Lee, et al. 2001. “A Conserved XIAP-interaction Motif in Caspase-9 and Smac/DIABLO Regulates Caspase Activity and Apoptosis.” *Nature* 410 (6824) (March 1): 112–6. doi:10.1038/35065125.
- Starkov, Anatoly A, and Gary Fiskum. 2003. “Regulation of Brain Mitochondrial H₂O₂ Production by Membrane Potential and NAD(P)H Redox State.” *Journal of Neurochemistry* 86 (5) (September): 1101–7.
- Steffan, J S, L Bodai, J Pallos, M Poelman, A McCampbell, B L Apostol, A Kazantsev, et al. 2001. “Histone Deacetylase Inhibitors Arrest Polyglutamine-dependent Neurodegeneration in Drosophila.” *Nature* 413 (6857) (October 18): 739–43. doi:10.1038/35099568.
- Stocker, Reinhard F. 1994. “Cell & Tissue Review Article The Organization of the Chemosensory System in Drosophila Melanogaster : a Rewiew”: 3–26.

- Stokin, Gorazd B, Angels Almenar-Queralt, Shermali Gunawardena, Elizabeth M Rodrigues, Tomás Falzone, Jungsu Kim, Concepción Lillo, et al. 2008. "Amyloid Precursor Protein-induced Axonopathies Are Independent of Amyloid-beta Peptides." *Human Molecular Genetics* 17 (22) (November 15): 3474–86. doi:10.1093/hmg/ddn240.
- Stone, Michelle C, Michelle M Nguyen, Juan Tao, Dana L Allender, and Melissa M Rolls. 2010. "Global Up-regulation of Microtubule Dynamics and Polarity Reversal During Regeneration of an Axon from a Dendrite." *Molecular Biology of the Cell* 21 (5) (March 1): 767–77. doi:10.1091/mbc.E09-11-0967.
- Strauss, R, and M Heisenberg. 1993. "A Higher Control Center of Locomotor Behavior in the Drosophila Brain." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (5) (May): 1852–61.
- Sugamori, K S, L L Demchyshyn, F McConkey, M a Forte, and H B Niznik. 1995. "A Primordial Dopamine D1-like Adenylyl Cyclase-linked Receptor from Drosophila Melanogaster Displaying Poor Affinity for Benzazepines." *FEBS Letters* 362 (2) (April 3): 131–8.
- Susin, S A, N Zamzami, M Castedo, T Hirsch, P Marchetti, A Macho, E Daugas, M Geuskens, and G Kroemer. 1996. "Bcl-2 Inhibits the Mitochondrial Release of an Apoptogenic Protease." *The Journal of Experimental Medicine* 184 (4) (October 1): 1331–41.
- Van Swinderen, Bruno, and Rozi Andretic. 2011. "Dopamine in Drosophila: Setting Arousal Thresholds in a Miniature Brain." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 278 (1707) (March 22): 906–13. doi:10.1098/rspb.2010.2564.
- Sánchez-Soriano, Natalia, Wolfgang Bottenberg, André Fiala, Ulrike Haessler, Afroditi Kerassoviti, Elisabeth Knust, Robert Löhr, and Andreas Prokop. 2005. "Are Dendrites in Drosophila Homologous to Vertebrate Dendrites?" *Developmental Biology* 288 (1) (December 1): 126–38. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.026.
- Tabas, Ira, and David Ron. 2011. "Integrating the Mechanisms of Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress." *Nature Cell Biology* 13 (3) (March): 184–90. doi:10.1038/ncb0311-184.
- Taira, Takahiro, Yoshiro Saito, Takeshi Niki, Sanae M M Iguchi-Ariga, Kazuhiko Takahashi, and Hiroyoshi Ariga. 2004. "DJ-1 Has a Role in Antioxidative Stress to Prevent Cell Death." *EMBO Reports* 5 (2) (February): 213–8. doi:10.1038/sj.embor.7400074.
- Takeyama, Ken-ichi, Saya Ito, Ayako Yamamoto, Hiromu Tanimoto, Takashi Furutani, Hirotaka Kanuka, Masayuki Miura, Tetsuya Tabata, and Shigeaki Kato. 2002. "Androgen-dependent Neurodegeneration by Polyglutamine-expanded Human Androgen Receptor in Drosophila." *Neuron* 35 (5) (August 29): 855–64.
- Tamura, Takuya, Masaki Sone, Mayumi Yamashita, Erich E Wanker, and Hitoshi Okazawa. 2009. "Glial Cell Lineage Expression of Mutant Ataxin-1 and Huntingtin Induces Developmental and Late-onset Neuronal Pathologies in Drosophila Models." *PloS One* 4 (1) (January): e4262. doi:10.1371/journal.pone.0004262.

- Tan, Jieqiong, Tongmei Zhang, Li Jiang, Jingwei Chi, Dongshen Hu, Qian Pan, Danling Wang, and Zhuohua Zhang. 2011. "Regulation of Intracellular Manganese Homeostasis by Kufor-Rakeb Syndrome-associated ATP13A2 Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (34) (August 26): 29654–62. doi:10.1074/jbc.M111.233874.
- Tan, Lihua, Paul Schedl, Ho-Juhn Song, Dan Garza, and Mary Konsolaki. 2008. "The Toll->NFkappaB Signaling Pathway Mediates the Neuropathological Effects of the Human Alzheimer's Abeta42 Polypeptide in Drosophila." *PloS One* 3 (12) (January): e3966. doi:10.1371/journal.pone.0003966.
- Tang, Tie-Shan, Xi Chen, Jing Liu, and Ilya Bezprozvanny. 2007. "Dopaminergic Signaling and Striatal Neurodegeneration in Huntington's Disease." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (30) (July 25): 7899–910. doi:10.1523/JNEUROSCI.1396-07.2007.
- Tanner, Caroline M, Freya Kamel, G Webster Ross, Jane A Hoppin, Samuel M Goldman, Monica Korell, Connie Marras, et al. 2011. "Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease." *Environmental Health Perspectives* 119 (6) (June): 866–72. doi:10.1289/ehp.1002839.
- Tanzi, Rudolph E, and Lars Bertram. 2005. "Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: a Genetic Perspective." *Cell* 120 (4) (February 25): 545–55. doi:10.1016/j.cell.2005.02.008.
- Tayebi, N, M Callahan, V Madike, B K Stubblefield, E Orvisky, D Krasnewich, J J Fillano, and E Sidransky. 2001. "Gaucher Disease and Parkinsonism: a Phenotypic and Genotypic Characterization." *Molecular Genetics and Metabolism* 73 (4) (August): 313–21. doi:10.1006/mgme.2001.3201.
- Taylor, J Paul, Addis A Taye, Catherine Campbell, Parsa Kazemi-Esfarjani, Kenneth H Fischbeck, and Kyung-Tai Min. 2003. "Aberrant Histone Acetylation, Altered Transcription, and Retinal Degeneration in a Drosophila Model of Polyglutamine Disease Are Rescued by CREB-binding Protein." *Genes & Development* 17 (12) (June 15): 1463–8. doi:10.1101/gad.1087503.
- Tempel, B L, M S Livingstone, and W G Quinn. 1984. "Mutations in the Dopa Decarboxylase Gene Affect Learning in Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (11) (June): 3577–81.
- Thorne, Natasha, Caroline Chromey, Steve Bray, and Hubert Amrein. 2004. "Taste Perception and Coding in Drosophila." *Current Biology : CB* 14 (12) (June 22): 1065–79. doi:10.1016/j.cub.2004.05.019.
- Tian, Lin, S Andrew Hires, Tianyi Mao, Daniel Huber, M Eugenia Chiappe, Sreekanth H Chalasani, Leopoldo Petreanu, et al. 2009. "Imaging Neural Activity in Worms, Flies and Mice with Improved GCaMP Calcium Indicators." *Nature Methods* 6 (12) (December): 875–81. doi:10.1038/nmeth.1398.
- Tofaris, George K, and Maria Grazia Spillantini. 2005. "Alpha-synuclein Dysfunction in Lewy Body Diseases." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 20 Suppl 1 (August): S37–44. doi:10.1002/mds.20538.

- Trinh, Kien, Laurie Andrews, James Krause, Tyler Hanak, Daewoo Lee, Michael Gelb, and Leo Pallanck. 2010. "Decaffeinated Coffee and Nicotine-free Tobacco Provide Neuroprotection in Drosophila Models of Parkinson's Disease Through an NRF2-dependent Mechanism." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (16) (April 21): 5525–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.4777-09.2010.
- Trinh, Kien, Katherine Moore, Paul D Wes, Paul J Muchowski, Joyoti Dey, Laurie Andrews, and Leo J Pallanck. 2008. "Induction of the Phase II Detoxification Pathway Suppresses Neuron Loss in Drosophila Models of Parkinson's Disease." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (2) (January 9): 465–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.4778-07.2008.
- Trump, B F, and I K Berezsky. 1995. "Calcium-mediated Cell Injury and Cell Death." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (2) (February): 219–28.
- Tschäpe, Jakob-Andreas, Christine Hammerschmied, Max Mühlig-Versen, Karin Athenstaedt, Günther Daum, and Doris Kretzschmar. 2002. "The Neurodegeneration Mutant Löchrig Interferes with Cholesterol Homeostasis and Appl Processing." *The EMBO Journal* 21 (23) (December 2): 6367–76.
- Turens, Julio F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2) (October 15): 335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Ueno, Taro, Naoki Masuda, Shoen Kume, and Kazuhiko Kume. 2012. "Dopamine Modulates the Rest Period Length Without Perturbation of Its Power Law Distribution in Drosophila Melanogaster." *PloS One* 7 (2) (January): e32007. doi:10.1371/journal.pone.0032007.
- Urano, F, X Wang, A Bertolotti, Y Zhang, P Chung, H P Harding, and D Ron. 2000. "Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1." *Science (New York, N.Y.)* 287 (5453) (January 28): 664–6.
- Usenovic, Marija, Emilie Tresse, Joseph R Mazzulli, J Paul Taylor, and Dimitri Krainc. 2012. "Deficiency of ATP13A2 Leads to Lysosomal Dysfunction, A-synuclein Accumulation, and Neurotoxicity." *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (12) (March 21): 4240–6. doi:10.1523/JNEUROSCI.5575-11.2012.
- Uversky, Vladimir N, and Anthony L Fink. 2002. "Amino Acid Determinants of Alpha-synuclein Aggregation: Putting Together Pieces of the Puzzle." *FEBS Letters* 522 (1-3) (July 3): 9–13.
- Vale, J A, T J Meredith, and B M Buckley. 1987. "Paraquat Poisoning: Clinical Features and Immediate General Management." *Human Toxicology* 6 (1) (January): 41–7.
- Valente, Enza Maria, Patrick M Abou-Sleiman, Viviana Caputo, Miratul M K Muqit, Kirsten Harvey, Suzana Gispert, Zeeshan Ali, et al. 2004. "Hereditary Early-onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1." *Science (New York, N.Y.)* 304 (5674) (May 21): 1158–60. doi:10.1126/science.1096284.

- Viana, André Luiz Machado, Miriam das Dores Mendes Fonseca, Elisson Lamin Jerônimo Meireles, Stella Maris da Silveira Duarte, Maria Rita Rodrigues, and Fernanda Borges de Araujo Paula. 2012. "Effects of the Consumption of Caffeinated and Decaffeinated Instant Coffee Beverages on Oxidative Stress Induced by Strenuous Exercise in Rats." *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 67 (1) (March): 82–7. doi:10.1007/s11130-011-0267-8.
- Vié, a, M Cigna, R Toci, and S Birman. 1999. "Differential Regulation of Drosophila Tyrosine Hydroxylase Isoforms by Dopamine Binding and cAMP-dependent Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (24) (June 11): 16788–95.
- Wallace, Douglas C. 2002. "Animal Models for Mitochondrial Disease." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 197 (January): 3–54. doi:10.1385/1-59259-284-8:003.
- Wang, Cheng, Ruifeng Lu, Xuezhi Ouyang, Michelle W L Ho, William Chia, Fengwei Yu, and Kah-Leong Lim. 2007. "Drosophila Overexpressing Parkin R275W Mutant Exhibits Dopaminergic Neuron Degeneration and Mitochondrial Abnormalities." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (32) (August 8): 8563–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.0218-07.2007.
- Wang, Jing W, Allan M Wong, Jorge Flores, Leslie B Vosshall, and Richard Axel. 2003. "Two-photon Calcium Imaging Reveals an Odor-evoked Map of Activity in the Fly Brain." *Cell* 112 (2) (January 24): 271–82.
- Wang, Xinnan, Dominic Winter, Ghazaleh Ashrafi, Julia Schlehe, Yao Liang Wong, Dennis Selkoe, Sarah Rice, Judith Steen, Matthew J LaVoie, and Thomas L Schwarz. 2011. "PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility." *Cell* 147 (4) (November 11): 893–906. doi:10.1016/j.cell.2011.10.018.
- Wang, Zuoren, Aakanksha Singhvi, Priscilla Kong, and Kristin Scott. 2004. "Taste Representations in the Drosophila Brain." *Cell* 117 (7) (June 25): 981–91. doi:10.1016/j.cell.2004.06.011.
- Warrick, J M, H Y Chan, G L Gray-Board, Y Chai, H L Paulson, and N M Bonini. 1999. "Suppression of Polyglutamine-mediated Neurodegeneration in Drosophila by the Molecular Chaperone HSP70." *Nature Genetics* 23 (4) (December): 425–8. doi:10.1038/70532.
- Warrick, J M, H L Paulson, G L Gray-Board, Q T Bui, K H Fischbeck, R N Pittman, and N M Bonini. 1998. "Expanded Polyglutamine Protein Forms Nuclear Inclusions and Causes Neural Degeneration in Drosophila." *Cell* 93 (6) (June 12): 939–49.
- Wassef, Ramez, Ronny Haenold, Alfred Hansel, Nathan Brot, Stefan H Heinemann, and Toshinori Hoshi. 2007. "Methionine Sulfoxide Reductase A and a Dietary Supplement S-methyl-L-cysteine Prevent Parkinson's-like Symptoms." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (47) (November 21): 12808–16. doi:10.1523/JNEUROSCI.0322-07.2007.
- Weihofen, Andreas, Kelly Jean Thomas, Beth L Ostaszewski, Mark R Cookson, and Dennis J Selkoe. 2009. "Pink1 Forms a Multiprotein Complex with Miro and Milton, Linking

- Pink1 Function to Mitochondrial Trafficking." *Biochemistry* 48 (9) (March 10): 2045–52. doi:10.1021/bi8019178.
- White, Katherine E, Dickon M Humphrey, and Frank Hirth. 2010. "The Dopaminergic System in the Aging Brain of *Drosophila*." *Frontiers in Neuroscience* 4 (January): 205. doi:10.3389/fnins.2010.00205.
- Whitworth, Alexander J, Dorothy A Theodore, Jessica C Greene, Helen Benes, Paul D Wes, and Leo J Pallanck. 2005. "Increased Glutathione S-transferase Activity Rescues Dopaminergic Neuron Loss in a *Drosophila* Model of Parkinson's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (22) (May 31): 8024–9. doi:10.1073/pnas.0501078102.
- Wightman, B, I Ha, and G Ruvkun. 1993. "Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *Lin-14* by *Lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans*." *Cell* 75 (5) (December 3): 855–62.
- Williams, D W, M Tyrer, and D Shepherd. 2000. "Tau and Tau Reporters Disrupt Central Projections of Sensory Neurons in *Drosophila*." *The Journal of Comparative Neurology* 428 (4) (December 25): 630–40.
- Wittmann, C W, M F Wszolek, J M Shulman, P M Salvaterra, J Lewis, M Hutton, and M B Feany. 2001. "Tauopathy in *Drosophila*: Neurodegeneration Without Neurofibrillary Tangles." *Science (New York, N.Y.)* 293 (5530) (July 27): 711–4. doi:10.1126/science.1062382.
- Wright, T R. 1987. "The Genetics of Biogenic Amine Metabolism, Sclerotization, and Melanization in *Drosophila Melanogaster*." *Advances in Genetics* 24 (January): 127–222.
- Wu, J, and R J Kaufman. 2006. "From Acute ER Stress to Physiological Roles of the Unfolded Protein Response." *Cell Death and Differentiation* 13 (3) (March): 374–84. doi:10.1038/sj.cdd.4401840.
- Xu, Dongbin, Sarah E Woodfield, Tom V Lee, Yun Fan, and Christian Antonio. 2010. "Genetic Control of Programmed Cell Death (apoptosis) in *Drosophila*." *Fly* 3 (1): 78–90.
- Xu, K, N Tavernarakis, and M Driscoll. 2001. "Necrotic Cell Death in *C. Elegans* Requires the Function of Calreticulin and Regulators of Ca^{2+} Release from the Endoplasmic Reticulum." *Neuron* 31 (6) (September 27): 957–71.
- Yamamoto, Misato, Ryu Ueda, Kuniaki Takahashi, Kaoru Saigo, and Tadashi Uemura. 2006. "Control of Axonal Sprouting and Dendrite Branching by the Nrg-Ank Complex at the Neuron-glia Interface." *Current Biology: CB* 16 (16) (August 22): 1678–83. doi:10.1016/j.cub.2006.06.061.
- Yang, Yufeng, Isao Nishimura, Yuzuru Imai, Ryosuke Takahashi, and Bingwei Lu. 2003. "Parkin Suppresses Dopaminergic Neuron-selective Neurotoxicity Induced by Pael-R in *Drosophila*." *Neuron* 37 (6) (March 27): 911–24.
- Yavich, Leonid, Heikki Tanila, Salla Vepsäläinen, and Pekka Jäkälä. 2004. "Role of Alpha-synuclein in Presynaptic Dopamine Recruitment." *The Journal of Neuroscience: the*

Official Journal of the Society for Neuroscience 24 (49) (December 8): 11165–70.
doi:10.1523/JNEUROSCI.2559-04.2004.

- Ye, Y, and M E Fortini. 1999. "Apoptotic Activities of Wild-type and Alzheimer's Disease-related Mutant Presenilins in *Drosophila Melanogaster*." *The Journal of Cell Biology* 146 (6) (September 20): 1351–64.
- Yellman, C, H Tao, B He, and J Hirsh. 1997. "Conserved and Sexually Dimorphic Behavioral Responses to Biogenic Amines in Decapitated *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8) (April 15): 4131–6.
- Zarranz, Juan J, Javier Alegre, Juan C Gómez-Esteban, Elena Lezcano, Raquel Ros, Israel Ampuero, Lídice Vidal, et al. 2004. "The New Mutation, E46K, of Alpha-synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia." *Annals of Neurology* 55 (2) (February): 164–73. doi:10.1002/ana.10795.
- Zars, T, M Fischer, R Schulz, and M Heisenberg. 2000. "Localization of a Short-term Memory in *Drosophila*." *Science (New York, N.Y.)* 288 (5466) (April 28): 672–5.
- Zhang, Yali, Huifu Guo, Helen Kwan, Ji-Wu Wang, Jon Kosek, and Bingwei Lu. 2007. "PAR-1 Kinase Phosphorylates Dlg and Regulates Its Postsynaptic Targeting at the *Drosophila* Neuromuscular Junction." *Neuron* 53 (2) (January 18): 201–15. doi:10.1016/j.neuron.2006.12.016.

ANNEXE

Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system

Thomas Riemensperger^{a,b}, Guillaume Isabel^c, Hélène Coulom^b, Kirs a Neuser^d, Laurent Seugnet^c, Kazuhiko Kume^e, Magali Ich e-Torres^b, Marlène Cassar^a, Roland Strauss^d, Thomas Preat^c, Jay Hirsh^f, and Serge Birman^{a,b,1}

^aGenetics and Physiopathology of Neurotransmission and ^cGenes and Dynamics of Memory Systems, Laboratoire de Neurobiologie, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles ParisTech, 75005 Paris, France; ^bInstitut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, 13009 Marseille, France; ^dInstitut für Zoologie III, Johannes Gutenberg Universität, 55099 Mainz, Germany; ^eInstitute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan; and ^fDepartment of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903

Edited by Howard Nash, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved November 30, 2010 (received for review August 3, 2010)

The neuromodulatory function of dopamine (DA) is an inherent feature of nervous systems of all animals. To learn more about the function of neural DA in *Drosophila*, we generated mutant flies that lack tyrosine hydroxylase, and thus DA biosynthesis, selectively in the nervous system. We found that DA is absent or below detection limits in the adult brain of these flies. Despite this, they have a lifespan similar to WT flies. These mutants show reduced activity, extended sleep time, locomotor deficits that increase with age, and they are hypophagic. Whereas odor and electrical shock avoidance are not affected, aversive olfactory learning is abolished. Instead, DA-deficient flies have an apparently "masochistic" tendency to prefer the shock-associated odor 2 h after conditioning. Similarly, sugar preference is absent, whereas sugar stimulation of foreleg taste neurons induces normal proboscis extension. Feeding the DA precursor L-DOPA to adults substantially rescues the learning deficit as well as other impaired behaviors that were tested. DA-deficient flies are also defective in positive phototaxis, without alteration in visual perception and optomotor response. Surprisingly, visual tracking is largely maintained, and these mutants still possess an efficient spatial orientation memory. Our findings show that flies can perform complex brain functions in the absence of neural DA, whereas specific behaviors involving, in particular, arousal and choice require normal levels of this neuromodulator.

neurotransmitters | locomotor activity | memory formation | choice behavior | feeding behavior

An important challenge in neuroscience is to understand the roles of specific neurotransmitter systems on brain homeostasis and functioning. Dopamine (DA), a biogenic amine biosynthesized from tyrosine, is an essential neuromodulator in the mammalian central nervous system that is involved in attention, movement control, motivation, and cognition. Studies in *Drosophila melanogaster* indicate that DA also plays central regulatory roles in insects, specifically in the neural networks controlling locomotor activity and stereotypical behaviors (1–3), sleep and arousal (4–7), registration of salient stimuli (4, 8, 9), and associative olfactory learning (10–15). Some of these studies were based on genetic inactivation or overactivation of dopaminergic neurons. Dopaminergic neurons can corelease other neuroactive agents, such as neuropeptides, however. Therefore, one must ensure that the behavioral phenotypes observed specifically result from the lack of DA release to draw firm conclusions on brain DA function.

Nearly all neuropil regions of the insect CNS receive dense dopaminergic innervation. In particular, the *Drosophila* adult brain contains six paired clusters of dopaminergic neurons, some of which specifically project to higher brain centers, such as the central complex and the mushroom bodies (1, 10, 12, 13, 16–18). Tyrosine hydroxylase (TH) catalyzes the first and rate-limiting step in DA biosynthesis (Fig. S1A). Because DA is also required in *Drosophila* as a precursor substrate for cuticle sclerotization and melanization, inactivating mutations of the genomic *TH*, alias

pale (*ple*) locus, results in unpigmented cuticle and late embryonic lethality (19).

Alternative splicing of *Drosophila TH* (*DTH*) produces two enzyme isoforms, DTH1 and DTH2 (20, 21) (Fig. S1B). DTH1 is selectively expressed in DA neurons within the CNS, whereas DTH2 is expressed in peripheral nonnervous tissues, which include the hypodermal cells that secrete the cuticle matrix (20, 22). Here, we take advantage of this tissue-specific alternative splicing to construct a mutated transgene, *DTHg^{FS±}*, that only expresses an active TH enzyme in nonneural cells. Homozygous *ple* mutants are rescued by this transgene to adult stage, generating *Drosophila* essentially devoid of DA in the adult brain. We then studied the consequences of this neural-specific DA depletion on adult survival and behavior.

Results

Generation of Viable DA-Deficient *Drosophila*. We first established the conditions for full rescue of *DTH* deficiency with the GAL4-upstream activation sequence (UAS) binary expression system by expressing genomic *DTH* (*DTHg*) driven by *TH-GAL4* and *Ddc-GAL4*, each of which contains regulatory sequences from genes involved in DA biosynthesis (Fig. S1A). The combined action of the *Ddc-GAL4* and *TH-GAL4* drivers is required for full rescue, with neither GAL4 driver alone being sufficient for full rescue to adult stage (Table S1).

We then used in vitro mutagenesis to introduce frameshift mutations in *DTHg* (Fig. S1 C and D and SI Materials and Methods). *DTHg^{FS+}* contains one additional base in a hypoderm-specific exon, and *DTHg^{FS±}* contains the same mutation plus another compensating mutation that removes one base in an adjacent common exon. When transcribed, *DTHg^{FS+}* only expresses active TH in neural tissues and, conversely, *DTHg^{FS±}* only expresses active TH in nonneural tissues. No *ple* rescue could be observed with *DTHg^{FS+}* (Table S2), confirming that an active DTH2 isoform producing cuticular DA is required for *Drosophila* development (22). In contrast, expression of *DTHg^{FS±}* yielded full rescue of *ple* to adulthood (Table S2), indicating that biosynthesis of neural DA is not essential for fly development and survival.

Immunohistochemistry confirmed that TH and DA are not detectable in adult brain of the *DTHg^{FS±}*-rescued *ple* mutants (Fig. 1A 3 and 6), whereas they are present in WT flies (Fig. 1A 1 and 4) or *ple* mutants rescued by the native *DTHg* construct (Fig. 1A 2

Author contributions: S.B. designed research; T.R., G.I., H.C., K.N., L.S., K.K., M.I.-T., J.H., and S.B. performed research; T.R., H.C., L.S., K.K., M.C., R.S., T.P., J.H., and S.B. contributed new reagents/analytic tools; T.R., G.I., H.C., K.N., L.S., K.K., R.S., T.P., J.H., and S.B. analyzed data; and T.R., J.H., and S.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: serge.birman@espci.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1010930108/-DCSupplemental.

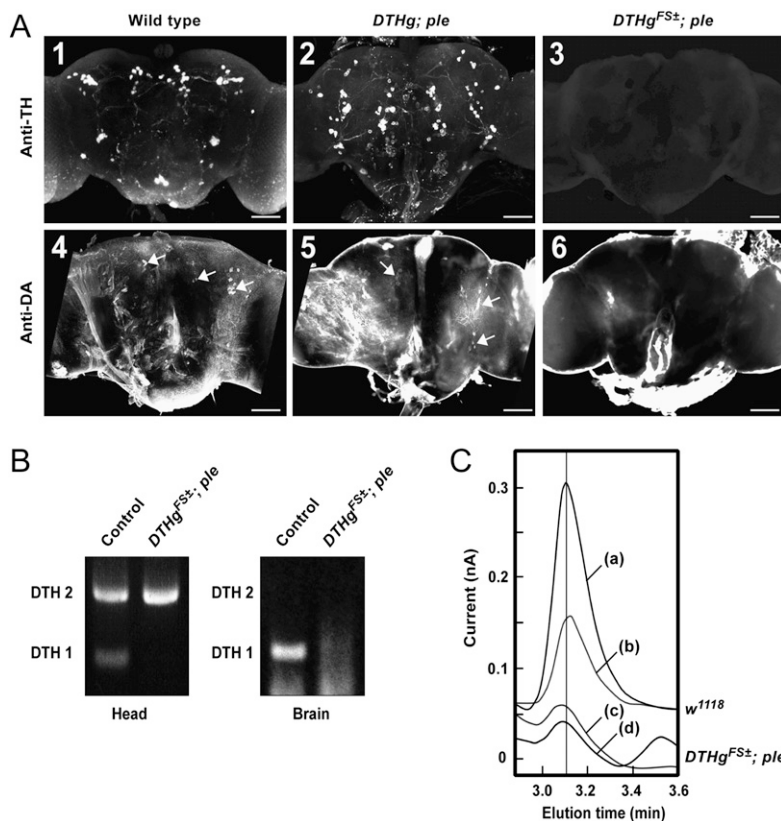


Fig. 1. Lack of TH expression and DA in the brain of *DTHg^{FS±}*-rescued *ple* *Drosophila*. (A) Anti-TH immunostaining on whole-mount adult brains of WT *Drosophila* (1) and *DTHg* (2) or *DTHg^{FS±}*-rescued (3) *ple* mutants. No TH immunoreactivity was detected in the brain of *DTHg^{FS±}*; *ple*. Anti-DA immunostaining. DA-positive cells can be observed in the brains of WT (4) and *DTHg*; *ple* (5) flies (arrows) but not in the brains of *DTHg^{FS±}*; *ple* flies (6). (B) Detection of the DTH1- and DTH2-specific spliced mRNAs by RT-PCR in heads (Left) and dissected brains (Right) of control or *DTHg^{FS±}*; *ple* flies. No DTH transcript is present in the brain of *DTHg^{FS±}*-rescued flies. (C) Representative graphs of DA assay by HPLC in brain extracts of control *w¹¹¹⁸* (a and b) and *DTHg^{FS±}*; *ple* (c and d) detected with an optimal potential of +500 mV (a and c) or reduced to +420 mV (b and d). (d) Reduced potential did not decrease the amplitude of the residual “DA” peak of neural TH-deficient flies, indicating that this peak is not DA. The small additional peak on the right corresponds to a contaminant from eye pigments.

and 5). Accordingly, RT-PCR shows that the neural-specific *DTH1* mRNA is absent in head and brain extracts of *DTHg^{FS±}*; *ple* (Fig. 1B). Similarly, no TH is present in the larval CNS of *DTHg^{FS±}*; *ple*, whereas it is expressed at this stage in *DTHg*; *ple* (Fig. S2A). In contrast, DA is detected in larval neurons of both strains, although fewer positive cells could be seen in larval brain hemispheres of *DTHg^{FS±}*; *ple* versus *DTHg*; *ple* (Fig. S2A3 and A4). This suggests that systemic DA produced by peripheral TH can partially supply the mutant larval CNS with the missing biogenic amine.

DA was then assayed by HPLC to determine the absolute magnitude of reduction of DA level in adult brain (Fig. 1C and Tables S3 and S4). Brain extracts from control flies and *DTHg*; *ple* showed equivalent levels of DA per brain (52.0 and 48.9 pg per brain, respectively), indicating that expression of the *DTHg* transgene quantitatively restored brain DA. In contrast, *DTHg^{FS±}*; *ple* flies apparently had 7.5 pg of DA per brain, suggesting a strong (~85%) but incomplete reduction of DA level in these mutants. HPLC was then repeated using a decreased detector potential of +420 mV, near the half-maximal oxidation potential of DA. Whereas the DA peak in an extract from a control brain behaves as expected (relative DA peak area at +420 vs. 500 mV: 0.43), the residual peak in the *DTHg^{FS±}*; *ple* strain was unaffected by the reduced detector potential (relative “DA” peak area: 1.05) (Fig. 1C and Tables S3 and S4). We conclude that the residual peak in this strain is largely, if not totally, a non-DA contaminant and that brains of *DTHg^{FS±}*; *ple* flies lack detectable DA, with an estimated sensitivity limit of 2% WT levels.

Nevertheless, adult brain of DA-deficient flies contains differentiated dopa decarboxylase (Ddc)-positive neurons that do not express serotonin and so are most likely “dopaminergic” neurons devoid of TH and DA. These cells indeed distribute in clusters identical to the WT pattern of dopaminergic neurons (Fig. S2B1–3). Moreover, characteristic dopaminergic innervation of the mushroom bodies appears normal in the mutant (Fig. S2B4–6). Therefore, maintenance of the adult brain dopaminergic system does not seem to depend on the activity of TH or the presence of DA in *Drosophila*.

DA Deficiency Reduces Activity and Arousal. Unexpectedly, we observed that both *DTHg*; *ple* and *DTHg^{FS±}*; *ple* lines show similar and normal adult life expectancy (Fig. S3A), demonstrating that the lack of neural DA has no detrimental effect on *Drosophila* lifespan. This enabled us to compare the behaviors of these lines. First, we studied the effect of neural DA deficiency on walking behavior of young adult flies. *DTHg^{FS±}*; *ple* show reduced walking speed (median = 7.8 mm/s) compared with *DTHg*; *ple* (median = 10.8 mm/s) and WT (median = 15 mm/s) (Fig. 2A, Left). Similarly, the distance covered for 15 min is much shorter in *DTHg^{FS±}*; *ple* (median = 193 cm) than in *DTHg*; *ple* (median = 425 cm) and WT (median = 474 cm) (Fig. 2A, Right). Therefore, flies deficient in neural DA show markedly decreased locomotor behavior.

Startle-induced negative geotaxis monitors climbing ability and excitability in *Drosophila*, and DA modulates this behavior (1, 23). WT flies placed in a vial or a column respond to a gentle

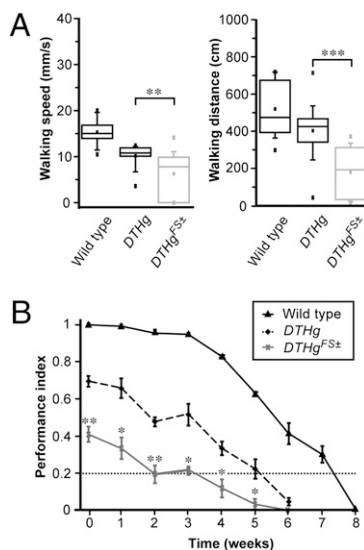


Fig. 2. Neural DA-deficient flies show locomotor deficits. (A) Box-and-whisker plots showing the distribution of walking speed (Left) and covered distance (Right) during spontaneous locomotor behavior of 5-d-old adult flies monitored in an open arena. The DA-deficient *DTHg^{FS±}*; *ple* flies show a statistically significant reduction compared with rescued *DTHg*; *ple* in both walking speed ($P = 0.015$) and covered distance ($P = 0.001$). *DTHg*; *ple* show a difference compared with WT flies for walking speed ($P = 0.0003$) but not walking distance ($P = 0.130$). Plots represent the median (horizontal line), mean (square), 25% and 75% quartiles (box), 10% and 90% quantiles (whiskers), and extreme values (crosses) ($***P < 0.02$ and $****P < 0.005$). (B) Climbing abilities of WT flies, *DTHg*; *ple*, and *DTHg^{FS±}*; *ple* monitored by startle-induced negative geotaxis as a function of adult age. The robust negative geotactic behavior of young WT *Drosophila* declines steadily over time after 3 wk. *DTHg^{FS±}*; *ple* show from the eclosion a strong impairment in this behavior; after 2 wk, their mean PI was only 0.2 (horizontal dotted line). *DTHg^{FS±}*; *ple* values were compared for significance with *DTHg*; *ple* values ($*P < 0.05$ and $**P < 0.02$, Student's *t* test).

mechanical shock by fast climbing. This behavior is stable over the first 3 wk of adult life and then progressively declines with age, such that by day ~55, WT flies show no response (Fig. 2B). The *DTHg^{FS±}*; *ple* flies do not perform well in this test, although they are definitely able to climb. Just after eclosion, their performance index (PI) was ~0.4, and at 15–21 d of age, their PI was only ~0.2, comparable to the PI of 50-d-old WT flies (Fig. 2B, dotted line). *DTHg*; *ple* show PIs between those of WT and DA-deficient flies (Fig. 2B).

Monitoring activity over the light/dark cycle indicates that *DTHg^{FS±}*; *ple* are overall less active and possibly sleep more frequently than *DTHg*; *ple* during the day (Fig. S3B). Because both strains showed frequent periods of relative inactivity, we also monitored sleep by direct observation. The results demonstrate that *DTHg^{FS±}*; *ple* do sleep more than *DTHg*; *ple* during both day and night (Fig. S3C). Furthermore, we found that sleeping *DTHg^{FS±}*; *ple* flies respond less frequently to mild and moderate mechanical stimuli (Fig. S3D), whereas response to strong stimuli was comparable to that of *DTHg*; *ple* flies. Overall, these results argue for a decreased arousal state in the absence of brain DA.

Treatment with 3-iodotyrosine (3IY), a TH inhibitor, decreases activity and increases resting periods in WT flies (4), whereas caffeine has the opposite effects (24). We observed that the neural TH-deficient *DTHg^{FS±}*; *ple*, as expected, are not responsive to 3IY, whereas *DTHg*; *ple* flies reacted like WT (Fig. S5). In contrast, caffeine was found to decrease resting periods of both *DTHg*; *ple* and *DTHg^{FS±}*; *ple* (Fig. S4), sug-

gesting that caffeine does not act by modulating DA release in *Drosophila*.

Impaired Aversive Olfactory Learning and Feeding Behavior. We used classical olfactory conditioning to evaluate the ability of *DTHg^{FS±}*; *ple* flies to associate an aversive stimulus (electrical shock) with an odor. Either immediately ($t = 0$) or 2 h after training, these flies did not show any avoidance of the shock-associated odor (Fig. 3A). This is in contrast to the *DTHg*-rescued controls that demonstrate associative memory ($PI = \sim 0.6$) (Fig. 3A), similar to WT (25). Interestingly, the DA-deficient flies showed an inverse tendency to choose the shock-associated odor during testing, an effect that was significant 2 h after training ($PI = -0.13 \pm 0.05$, $n = 9$). We checked that shock avoidance (Fig. S5A) and odor perception (Fig. S5B) are preserved in DA-deficient as well as *DTHg*-rescued flies.

Pharmacological rescue experiments were performed in adult flies to distinguish between physiological or developmental effects of brain DA deficiency. Remarkably, treatment of adult *DTHg^{FS±}*; *ple* with the DA precursor L-DOPA significantly improved their negative geotaxis behavior (Fig. S6A). This indicates that progressive locomotor impairments directly result from DA deficiency and not from developmental abnormalities. Similarly, L-DOPA feeding of adult DA-deficient flies substantially increased their learning performance index towards a positive value ($PI = 0.26 \pm 0.08$ with L-DOPA compared to -0.11 ± 0.07 without L-DOPA at $t = 0$, $n = 6$) (Fig. S6B), confirming that the lack of neural DA induces an absolute defect in aversive olfactory memory.

Preparatory to appetitive conditioning trials, we tested the flies for sugar preference after a 21-h period of starvation. Whereas *DTHg*-rescued controls respond positively and comparably to WT, *DTHg^{FS±}*; *ple* flies showed no significant response to sucrose (Fig. 3B). The proboscis extension reflex appears normal in these mutants (Movie S1), however, indicating that sugar perception and reflex appetitive reactions are preserved. This suggests that neural DA is specifically required for behavioral attraction to sugar. Quantification of food intake revealed that *DTHg^{FS±}*; *ple* eat one-third as much as *DTHg*; *ple* (Fig. S6C), demonstrating that they are markedly hypophagic. Again, L-DOPA significantly improves this phenotype, whereas the drug has no effect on food intake of *DTHg*; *ple* flies. Interestingly, L-DOPA also has a positive effect on food intake of heterozygous *ple* flies (Fig. S6C), suggesting a dominant effect of *ple* on feeding behavior.

Lack of Phototaxis but Preserved Visual Orientation and Spatial Memory. Positive phototaxis is a characteristic behavior of *Drosophila* and many other insect species. In counter-current assay, *DTHg^{FS±}*; *ple* flies were mainly recovered in the first tube of the apparatus, indicating that they are not attracted by light, whereas *DTHg*; *ple* showed partial rescue of phototactic behavior (Fig. 3C). The mutants have normal electroretinograms (Fig. S5C) and optomotor response (Fig. S5D), indicating that visual functions are preserved. We also performed individual assays to rule out the possibility that the lack of positive response in the counter-current test was attributable to reduced activity. A single fly was placed at the entrance of a T-maze and allowed to choose freely between a dark tube and an illuminated tube until it reached one of the vials. Similar to WT, neurally rescued *DTHg*; *ple* show a significant preference toward the lighted tube. In contrast, *DTHg^{FS±}*; *ple* single flies show no preference, choosing either tube with equal probability (Fig. 3D).

We further checked the flies for visual tracking and orientation in the Buridan's paradigm, a cylindrical virtual reality arena in which two dark vertical stripes are presented opposite to each other. Under standard conditions, WT flies patrol between two given visual targets for a considerable length of time. Whole orientation curves indicate that *DTHg*; *ple* and *DTHg^{FS±}*; *ple* are comparably able to target the two stripes, with a fixation ability

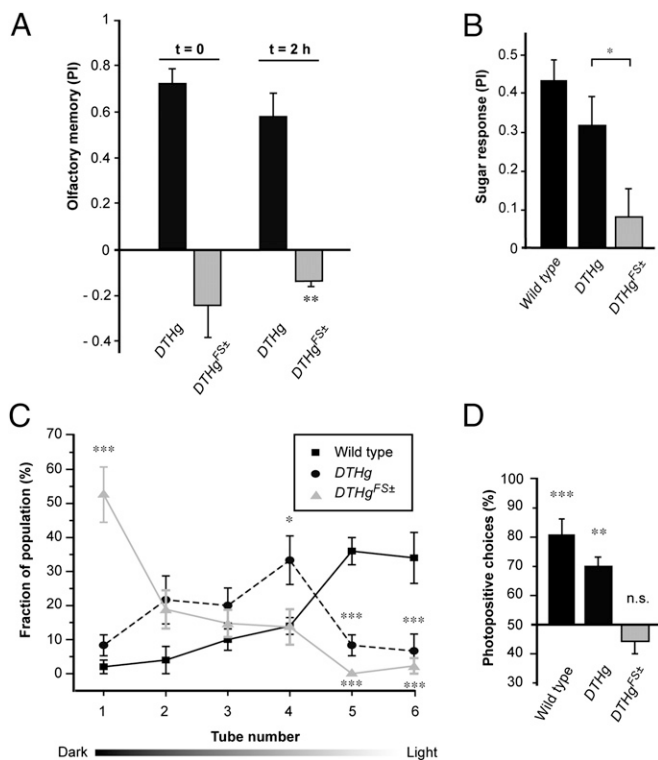


Fig. 3. Behaviors disrupted in neural DA-deficient *Drosophila*. (A) Aversive olfactory learning. The PI of flies tested either immediately ($t = 0$) or 2 h after electrical shock training is shown. Whereas *DTHg; ple* show normal conditioned avoidance of the aversive odor, the neural DA-deficient *DTHg^{FS±}; ple* do not learn. They rather show an abnormal preference for the shock-associated odor that is statistically significant 2 h after training ($P = 0.312$ at $t = 0$ and $**P = 0.012$ at $t = 2$ h, Wilcoxon signed-rank test against 0 as random behavior). (B) Sugar preference. After a 21-h starvation period, flies were tested in a T-maze for their response to sucrose. WT and *DTHg*-rescued *Drosophila* show positive responses to sugar, whereas *DTHg^{FS±}; ple* flies appear not to be attracted ($*P < 0.05$, Student's t test). The sugar response of the *DTHg^{FS±}; ple* flies was not different from 0 as random behavior (Wilcoxon signed-rank test). (C) Phototaxis assayed by countercurrent distribution. WT *Drosophila* display strong phototactic behavior and mostly distributes toward the light source in tubes 5 and 6. In contrast, most *DTHg^{FS±}; ple* flies remain in tube 1. This behavioral impairment is partially rescued in *DTHg; ple* flies [$***P < 0.0001$, one-way ANOVA (Bonferroni-corrected) compared with WT values]. (D) Single-fly phototaxis assay. Flies were allowed to distribute freely between an illuminated tube and a dark tube. WT and *DTHg*-rescued *Drosophila* showed a strong preference for the illuminated tube. In contrast, the neural DA-deficient *DTHg^{FS±}; ple* distributed equally [$***P = 6.1 \times 10^{-5}$, $**P = 0.012$, and $P = 0.499$ (not significant [n.s.]) for WT, *DTHg; ple*, and *DTHg^{FS±}; ple*, respectively, Wilcoxon signed-rank test; mean tested against reference constant (50% for equal distribution)].

different from random behavior, although less efficiently than WT flies (Fig. 4A). A closer look at the curves shows that both mutants differ in their orientation ability at small deviation angles (Fig. 4B), suggesting that the lack of DA makes visual orientation slightly less accurate. Therefore, in *Drosophila*, the presence of neural DA improves visual tracking but, nevertheless, is dispensable for this behavior.

Orientation in a changing environment requires the ability to retain and recall the position of a target. *Drosophila* possesses such a spatial orientation memory that can be tested by the detour paradigm. In this test, a fly walks toward a landmark that suddenly disappears while, simultaneously, a vertical distracter stripe appears laterally to the fly. After the fly approaches this second landmark, the distracter stripe also disappears within 1 s. In this

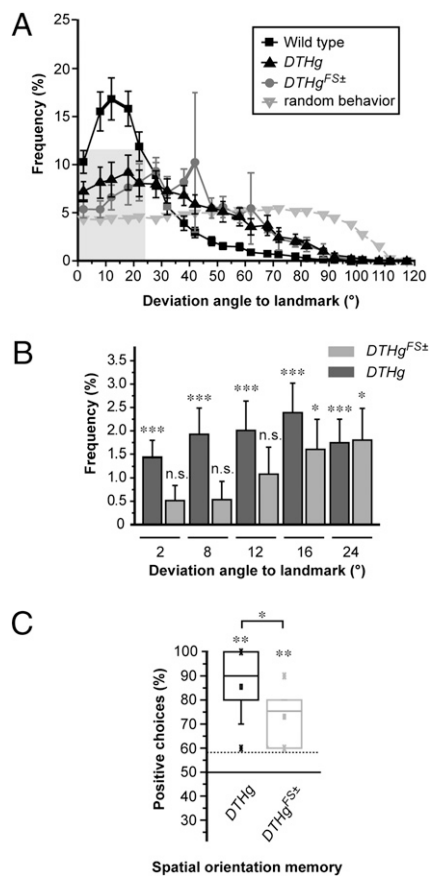


Fig. 4. Visual fixation and spatial memory are largely preserved in the absence of brain DA. (A) Whole orientation curves showing frequency of angle deviation between the fly trajectory and approached target. Mutant and rescue flies show a frequency distribution significantly different from the calculated random behavior (*DTHg; ple*: $P = 0.007$ and *DTHg^{FS±}; ple*: $P = 0.005$, F test), whereas both strains do not differ from each other ($P = 0.455$; mean of 13 flies of each genotype). This confirms that *DTHg; ple* and *DTHg^{FS±}; ple* flies are able to visualize and target the landmarks, although less consistently than WT flies (*DTHg; ple*: $P = 0.028$ and *DTHg^{FS±}; ple*: $P = 0.036$, F test). (B) Differences between angles to the approached target and calculated random behavior for small deviations (derived from shaded area of curves in A) are shown. Trajectories of *DTHg^{FS±}; ple* target the landmarks but are not accurate, making angle frequency not significantly different from random behavior for small deviations [$*P < 0.05$, not significant (n.s.)]. This defect is rescued in *DTHg; ple* flies that contain neural DA ($***P < 0.005$). The Wilcoxon signed-rank test was used against 0 as random behavior. (C) Test of spatial orientation memory in the detour paradigm (details are provided in *Materials and Methods*). Ten flies per genotype and 10 tests per fly were recorded. The frequency of positive choices is represented by box-and-whisker plots showing the median (horizontal line), mean (square), 25% and 75% quartiles (box), 10% and 90% quantiles (whiskers), and extreme values (crosses). Random behavior would result in a reference value of 58% (horizontal dotted line). The *DTHg^{FS±}; ple* flies still retain spatial orientation memory ($**P = 0.0015$, one-sample sign test against the random value), although their performance is reduced compared with the *DTHg; ple* flies ($*P = 0.034$, Mann-Whitney U test).

situation, WT flies will turn back to their previous, still invisible, landmark, demonstrating a spatial orientation memory for their former target with a median frequency of $\sim 80\%$ (26). We observed that both *DTHg; ple* and *DTHg^{FS±}; ple* do recall the position of the first landmark with a median frequency of 90% and 73%, respectively (Fig. 4C). This demonstrates that the lack of brain DA has only a minor impact on spatial orientation memory in *Drosophila*.

Discussion

Here, we describe specific genetic tools to study DA as a signaling molecule in the *Drosophila* brain. We show that the embryonic lethality of *ple* is fully rescued by a combination of dopaminergic drivers (*Ddc-GAL4* and *TH-GAL4*) expressing a frameshift mutant of the TH gene (*DTHg^{FS±}*). The *DTHg^{FS±}; ple* mutants only express TH in nonneural tissues, principally the cuticle-producing cells of the hypoderm. This leads to the absence of DA in adult brain without apparent morphological disturbance of the dopaminergic system, as attested by L-DOPA rescue of defective behaviors. The resulting flies are fully viable with a normal lifespan and they show a number of distinctive phenotypes.

Mutants without neural DA show reduced locomotor activity and arousal, and they sleep significantly more than control flies during both day and night, consistent with previous reports on the role of DA in these behaviors (4–6). The lack of further effect of a TH inhibitor (3IY) demonstrates that spontaneous activity is not influenced by trace levels of neural DA or by cuticular DA in these flies. Other reports indicate that blockade of dopaminergic synaptic transmission increases activity, particularly startle-induced activity (1, 7, 27). This apparent discrepancy cannot be fully explained at present but might be related to the fact that only part of brain DA signaling is inhibited with the use of *GAL4* drivers that do not express in the entire dopaminergic system.

The role of dopaminergic neurons in *Drosophila* aversive olfactory learning has been widely studied before (10–15). The present results show conclusively that DA is the critical signaling molecule released by these neurons that is required for this form of associative memory. Interestingly, although electrical shock avoidance is not altered, we observed that the DA-deficient flies have a striking tendency to choose the shock-associated odor 2 h after training, indicative of an inversion of the evaluation system. Such an apparently “masochistic” behavior could result from an inability of these flies to attribute a negative value to a reinforcing stimulus, leading to a bias toward an appetitive behavior. In a possibly related observation, Krashes et al. (12) recently reported that specific DA neurons can inhibit the expression of an appetitive memory performance.

Our study reveals the requirement for neural DA in sugar preference and normal food intake in *Drosophila*. The fact that serotonin is also involved in feeding in flies (28) suggests that these two biogenic amines directly interact in the control of this behavior. The lack of sugar preference, despite the intact proboscis extension reflex, may suggest that DA is required for reward and motivation in flies, as is the case in mammals, but this would need further work to be established. Remarkably, several of the deficits we observe in DA-deficient *Drosophila*, (e.g., hypoactivity and hypophagy readily rescued by L-DOPA) are quite similar to phenotypes observed in DA-deficient mice (29). The same is true for the preservation of dopaminergic neuron circuits. This argues for partial conservation of brain DA functions between flies and mammals.

The lack of phototaxis does not result from blindness because flies without neural DA have normal electroretinograms and optomotor response. Circadian entrainment to dim light also requires neural DA (30). We suspect that this is not related to the phototaxis defect, which was tested under high levels of illumination. An unexpected result of this study is that visual tracking and spatial orientation memory are largely retained in *Drosophila* lacking neural DA. Although neural DA improves visual fixation and orientation toward a landmark, possibly by increasing arousal level and attention (8), this neuromodulator appears to be dispensable for these behaviors. Our results, in agreement with previous findings (26, 31), suggest that the neural circuits involved in the formation of spatial memory do not depend on neural DA.

In conclusion, we find that activity, feeding, and certain choice behaviors are markedly altered or abolished in neural DA-deficient

flies, whereas other complex behaviors are surprisingly well maintained and might be similar to WT without the decrease in arousal. This suggests that DA is implicated in many but not all aspects of brain functioning in *Drosophila*. The specific behaviors that absolutely require DA could be related to the primordial and evolutionarily conserved functions of this essential neuromodulator in primitive nervous systems.

Materials and Methods

Further details and references of the procedures are provided in *SI Materials and Methods*.

***Drosophila* Strains.** *DTHg-* and *DTHg^{FS±}-*rescued homozygous *ple* *Drosophila* were generated before each experiment by crossing a line containing the combined *TH-GAL4* and *Ddc-GAL4* drivers with the respective *UAS* transgene, each in a heterozygous *ple* mutant background. The Canton S strain was used as WT flies for comparison in behavior tests.

Immunohistochemistry. Adult brains were dissected in ice-cold *Drosophila* Ringer's solution and processed for whole-mount immunostaining by standard procedure. The following primary antibodies were used: rabbit anti-DA (1:100; ImmunoStar), rabbit anti-serotonin (1:500; Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-TH (1:50; ImmunoStar), rat anti-Ddc (1:200; prepared in the laboratory of J.H.), and rabbit anti-GFP (1:500; Invitrogen Molecular Probes).

DA Assay. DA levels in *Drosophila* brain extracts were determined by HPLC coupled to electrochemical detection essentially using a mobile phase containing 4 mM decanesulfonic acid, 50 mM citrate/acetate (pH 4.5), and 20% (vol/vol) acetonitrile. Standard detection of DA was performed at a detector potential of +500 mV relative to an Ag/AgCl electrode. Electrochemical confirmation of the identity of the DA peaks was performed at a reduced potential of +420 mV.

Locomotor Behavior. Two methods were used to test for spontaneous locomotor behavior of 2- to 5-d-old adult *Drosophila*. First, walking speed and covered distance were computed from video-based recordings of individual flight-disabled flies walking freely for 15 min in an open arena. Second, activity was monitored by recording infrared beam crossings in glass tubes (6.5-cm length, 3-mm inside diameter) using a *Drosophila* activity monitoring system (TriKinetics).

Olfactory Conditioning. To test for aversive olfactory learning, groups of about 35 flies were conditioned in a barrel-type machine by sequential exposure to two odors, octanol and methylcyclohexanol, for 60 s with 45-s rest intervals between presentation of odors (25). Exposure to the first odor was paired with electrical shocks.

Phototaxis. Phototactic behavior was tested by mass and single-fly assays. The mass assay was carried out in a dark room with the countercurrent procedure. The results were the mean of the scores from five trials. Data were statistically analyzed with a one-way ANOVA (Bonferroni-corrected). The single-fly phototaxis assay was performed using a T-maze system in which flies choose freely between an illuminated vial and a dark vial. The test was repeated five times with each fly ($n = 16$), and the percentage of photopositive choices was scored. Data were analyzed with the Wilcoxon signed-rank test.

Visual Fixation and Orientation. Orientation toward a landmark was analyzed in the Buridan's paradigm on freely walking 5-d-old *Drosophila* with shortened wings. The angular deviation between fly trajectory and the approached target was measured every 0.2 s for 15 min. Spatial orientation memory was tested in the detour paradigm (26). Ten consecutive trials of at least 10 flies per genotype were recorded. Data were analyzed with the Kruskal–Wallis ANOVA test.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Erich Buchner for help with the electroretinogram and optomotor assays, Isabelle Rivals for advice on statistical analyses, and Scott Waddell and Burkhard Poock for helpful discussions. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Fondation de France (to S.B.), the National Institutes of Health (to J.H.), and Agence Nationale pour la Recherche (to T.P.), and by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant STR590-4 (to R.S.). Fellowships were provided by the Fondation pour la Recherche Médicale (to H.C. and T.R.) and Fondation Pierre-Gilles de Gennes (to L.S. and T.R.).

1. Friggi-Grelin F, et al. (2003a) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol* 54:618–627.
2. Lima SQ, Miesenböck G (2005) Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell* 121:141–152.
3. Yellman C, Tao H, He B, Hirsh J (1997) Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4131–4136.
4. Andretic R, van Swinderen B, Greenspan RJ (2005) Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr Biol* 15:1165–1175.
5. Ganguly-Fitzgerald I, Donlea J, Shaw PJ (2006) Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science* 313:1775–1781.
6. Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J, Jackson FR (2005) Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci* 25:7377–7384.
7. Lebestky T, et al. (2009) Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. *Neuron* 64:522–536.
8. Ye Y, Xi W, Peng Y, Wang Y, Guo A (2004) Long-term but not short-term blockade of dopamine release in *Drosophila* impairs orientation during flight in a visual attention paradigm. *Eur J Neurosci* 20:1001–1007.
9. Zhang K, Guo JZ, Peng Y, Xi W, Guo A (2007) Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science* 316:1901–1904.
10. Claridge-Chang A, et al. (2009) Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell* 139:405–415.
11. Kim YC, Lee HG, Han KA (2007) D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J Neurosci* 27:7640–7647.
12. Krashes MJ, et al. (2009) A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* 139:416–427.
13. Riemensperger T, Völler T, Stock P, Buchner E, Fiala A (2005) Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* 15:1953–1960.
14. Schwaerzel M, et al. (2003) Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23:10495–10502.
15. Seugnet L, Suzuki Y, Vine L, Gottschalk L, Shaw PJ (2008) D1 receptor activation in the mushroom bodies rescues sleep-loss-induced learning impairments in *Drosophila*. *Curr Biol* 18:1110–1117.
16. Mao Z, Davis RL (2009) Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: Anatomical and physiological heterogeneity. *Front Neural Circuits* 3:5.
17. Nässel DR, Elekes K (1992) Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: Dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res* 267:147–167.
18. Tanaka NK, Tanimoto H, Ito K (2008) Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* 508:711–755.
19. Neckameyer WS, White K (1993) *Drosophila* tyrosine hydroxylase is encoded by the *pale* locus. *J Neurogenet* 8:189–199.
20. Birman S, Morgan B, Anzivino M, Hirsh J (1994) A novel and major isoform of tyrosine hydroxylase in *Drosophila* is generated by alternative RNA processing. *J Biol Chem* 269:26559–26567.
21. Vié A, Cigna M, Toci R, Birman S (1999) Differential regulation of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms by dopamine binding and cAMP-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 274:16788–16795.
22. Friggi-Grelin F, Iché M, Birman S (2003b) Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis* 35:175–184.
23. Bainton RJ, et al. (2000) Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Curr Biol* 10:187–194.
24. Andretic R, Kim YC, Jones FS, Han KA, Greenspan RJ (2008) *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20392–20397.
25. Pascual A, Prémat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
26. Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R (2008) Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453:1244–1247.
27. Alekseyenko OV, Lee C, Kravitz EA (2010) Targeted manipulation of serotonergic neurotransmission affects the escalation of aggression in adult male *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 5:e10806.
28. Neckameyer WS (2010) A trophic role for serotonin in the development of a simple feeding circuit. *Dev Neurosci* 32:217–237.
29. Zhou QY, Palmiter RD (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipic, and aphagic. *Cell* 83:1197–1209.
30. Hirsh J, et al. (2010) Roles of dopamine in circadian rhythmicity and extreme light sensitivity of circadian entrainment. *Curr Biol* 20:209–214.
31. Sitaraman D, et al. (2008) Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5579–5584.

Supporting Information

Riemensperger et al. 10.1073/pnas.1010930108

SI Materials and Methods

Drosophila Culture and Transformation. Fly stocks and crosses were raised at 25 °C on standard corn meal-yeast-agar medium supplemented with methyl-4-hydroxy-benzoate as a mold protector under a 12-h/12-h light/dark cycle and at around 50% humidity. *Drosophila* transformants were obtained by standard procedure: w^{1118} embryos were microinjected in their posterior pole with 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transformation vector and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ helper plasmid $\pi 25.7\text{wc}$ (1) as a source of transposase.

Drosophila Strains. The following fly strains were used: Canton S for behavior tests and w^{1118} for HPLC assays as WT flies, *TH-GAL4* (2), *Ddc-GAL4* (3), *UAS-DTHg* (4), *UAS-DTHg^{FS+}* and *UAS-DTHg^{FS±}* (see below). The *ple^{2cl}* chromosome (2), which contains the null *DTH* mutant allele *ple²* (5) cleared from other chromosomal mutations, was kept balanced by the *TM6B* (*Tb*) chromosome. *DTHg*- and *DTHg^{FS±}*-rescued homozygous *ple* *Drosophila* were generated by crossing a line containing the combined *TH-GAL4* and *Ddc-GAL4* drivers with the respective *UAS* transgene, each in a heterozygous *ple* mutant background. Because both male and female flies are fertile, *DTHg*; *ple* and *DTHg^{FS±}*; *ple* can be maintained as stable lines. To reduce the risk of genetic compensation over generations, however, we preferred to generate them by crossing heterozygous *ple* progenitors before each experiment. The *DTHg^{FS±}*; *ple*/+ flies generated in these crosses were used as heterozygous *ple* controls in Fig. 1B and Fig. S6. If not stated otherwise, all experiments were performed with 3- to 5-day-old adult female flies.

DNA Constructs. Frameshift mutations were introduced in vitro in the *DTH* gene by a modification of the three-primer PCR mutagenesis procedure (6) as described previously (7). Mutagenizing antisense *DTH* primers OTH⁺ (5'-GCTGTTGIGTTCCTCTGG) and OTH⁻ (5'-CCAAACAAA_CTCGTCTCGG) were used, respectively, to introduce a base near the end of exon d or to remove a base at the beginning of exon e (Fig. S2B). Mutated *DTHg^{FS+}* or double-mutated *DTHg^{FS±}* segments were then inserted in place of the corresponding WT sequence in the *pUAS-DTHg* vector (4), generating *pUAS-DTHg^{FS+}* and *pUAS-DTHg^{FS±}*. These mutations were checked by PCR and confirmed by double-stranded DNA sequencing before *Drosophila* transformation. *DTHg^{FS+}* produces a mutated hypodermal enzyme isoform (*DTH2^{FS+}*) that is truncated before the catalytic domain and terminated by a nonsense mutation (Fig. S1 C and D) and a normal neural *DTH1* isoform. *DTHg^{FS±}* produces a mutated hypodermal enzyme isoform (*DTH2^{FS±}*) that contains 15 missense amino acids in a noncritical region between the regulatory and catalytic domains (Fig. S1 C and D) and a truncated inactive CNS splice isoform.

ple Rescue. To compare the *ple* rescue capability of different *GAL4* driver/*UAS-DTH* combinations, the following procedure was used as described previously (4). First and second chromosome insertions of the *X-GAL4* (i.e., *Ddc-GAL4*, *TH-GAL4*, or both) and *UAS-DTH* transgenes were homozygosed in *ple^{2cl}/TM6B* (*Tb*, *Hu*, *e*) background, and third chromosome insertions were recombined to the *ple^{2cl}* chromosome and balanced by *TM6B*. *X-GAL4*, *ple/TM6B* virgin female flies were mated to *UAS-DTH*, *ple/TM6B* male flies, and reciprocal crosses were set up (i.e., *UAS-DTH*, *ple/TM6B* virgin female flies mated to *X-GAL4*, *ple/TM6B* male flies). Rescue from *ple* embryonic lethality was determined by scoring the relative number of homozygous *ple* (i.e., *Tb⁺*, *Hu⁺*) pupae and adults recovered in the progeny of these crosses.

RT-PCR. RNA was extracted from 15 adult heads or 25 dissected adult brains by the TRIzol (Invitrogen) procedure (8). The final RNA pellets were washed in 75% (vol/vol) ethanol before resuspension in diethylpyrocarbonate-treated water. After annealing with a *DTH* antisense primer (OTH5, exon e, 5'-ATTGCGATCTCGGCAATTTCTTTCGCGACGCTGGC), RT was carried out in the presence of SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR primers (OTH2, *DTH* antisense exon e, and OTH3, *DTH* sense exon a) and reaction conditions were as previously described (9), leading to the amplification of a 195-kb fragment and a 408-kb fragment from the *DTH1* and *DTH2* cDNAs, respectively.

Immunohistochemistry. According to the experiments, the secondary antibodies were goat anti-mouse, anti-rabbit, or anti-rat IgG conjugated to Alexa Fluor 488 or 555 (1:500; Invitrogen Molecular Probes). For TH, Ddc, serotonin, and GFP immunostaining, brains were dissected in *Drosophila* Ringer's solution [130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.35 mM KH₂PO₄ (pH 7.5)] and fixed for 2 h on ice in 4% (wt/vol) paraformaldehyde in PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄), followed by three 20-min washes in PBS. After 2 h of preincubation in PBS containing 0.5% Triton X-100 (PBT) plus 2% (wt/vol) BSA, brains were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted in the same solution. This was followed by three 20-min washes in PBT, a 2-h incubation with the secondary antibodies at room temperature, three 20-min washes in PBT again, and one final wash in PBS. For DA immunostaining, brains were dissected in Ca²⁺-free *Drosophila* Ringer's solution supplemented with 1.25% (wt/vol) glutaraldehyde plus 1% sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅) (Sigma) to protect DA from oxidation and then were fixed in the same solution for 3 h on ice. After three 20-min washes in PBS, brains were incubated for 20 min in PBS containing 0.5% sodium borohydride (NaBH₄) to saturate double bonds, followed by 20 min in PBS plus 1% (wt/vol) Na₂S₂O₅. After overnight preincubation in blocking solution (PBS + 2% (wt/vol) BSA), brains were incubated for 2 d at 4 °C with the primary antibody diluted in the same solution and then washed three times in PBS at room temperature before being incubated for 2 d with the secondary antibody in PBS. Brains were finally washed in PBS for 2 d at 4 °C to reduce background. Tissues were mounted in Vectashield (Vector Laboratories). Confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM 510 microscope.

Lifespan Analysis. Survival in standard conditions was determined at 25 °C on a population of 100–125 female flies of each genotype divided in five batches. Each batch was treated independently. Newly eclosed flies were placed in vials and transferred every 2–3 d into fresh vials to minimize death caused by bacterial infection or moist medium. The number of surviving flies was recorded every 2 d. Survival curves represent the percentage of surviving flies as a function of time.

Locomotor Behavior. Two methods were used to test for spontaneous locomotor behavior of 2- to 5-day-old adult *Drosophila*. First, walking speed and covered distance were computed from video-based recordings of individual flight-disabled flies (wings cut to one-third of length 1 d before the experiment under cold anesthesia) walking freely for 15 min in an open arena (10). Path lengths were calculated for five successive 3-min intervals of undisturbed walking and averaged over individuals. Walking speeds

were calculated for every transition between the landmarks. Because some data were not normally distributed (Shapiro–Wilks W test), we used the Mann–Whitney U test for pairwise comparison ($n = 13$ flies). Alternatively, activity was monitored by recording infrared beam crossings in glass tubes (6.5-cm length, 3-mm inside diameter). In this case, events were scored at 1-min intervals for 3 d (with light/dark or dark/dark circadian cycles) using a *Drosophila* activity monitoring system (DAM; TriKinetics) (11). To analyze the effect of drugs on locomotor activity, 2- to 3-d-old male flies were placed in monitor tubes in which regular food was replaced by either sucrose alone (control) or sucrose supplemented with 0.5 mg/mL caffeine or 3 mM 3IY, a TH inhibitor.

Negative Geotaxis. Startle-induced negative geotaxis was assayed as previously described (2). Groups of 10–20 flies were placed in a vertical column (25 cm long, 1.5 cm in diameter) with a conical bottom end. They were suddenly startled by gently tapping them down, to which *Drosophila* respond by climbing up. After 1 min, flies having reached the top of the column (above 20.5 cm) and flies remaining at the bottom end (below 6.5 cm) were separately counted. Three trials were performed at 1-min intervals. The scores are the mean of the numbers of flies at the top (n_{top}) and bottom (n_{bot}), expressed as percentages of the total number of flies (n_{tot}). Results are the mean \pm SEM of the scores obtained in three independent experiments. The PI is defined as $1/2((n_{tot} + n_{top} - n_{bot})/n_{tot})$. To test for the effect of aging on negative geotaxis, 30 flies of each condition were evaluated each week throughout a period of 8 wk. Dead flies were replaced by substitutes of the same age. Statistical analysis was performed on the PIs with the Student's t test.

Sleep and Arousal. Circadian activity was followed with a DAM system for 72 h at 18 °C in a 12-h/12-h light/dark cycle. Individual flies were placed in small glass tubes (5-cm length, 3-mm inside diameter) containing food medium with an infrared laser beam passing through the midline of the tubes. Apparent sleep was defined as periods of 5 min or longer without laser beam breaks. To monitor sleep by direct observations, individual flies placed in similar tubes were visually observed for 30-min periods during day [Zeitgeber time (ZT) 8–10] or night (with a red light, ZT 14–15) to determine the duration of quiescent intervals. Sleep was defined as periods of 5 min or longer without any movement. Similar results were obtained with three independent batches of flies. Arousal state was evaluated by applying mechanical stimulations during sleep as previously described (11). Mild and moderate stimuli were delivered by quickly removing 7- or 16-mm thick plastic cushions, respectively, from below the monitors. Flies maintained in 12-h/12-h light/dark cycles were stimulated every 2 h with mild stimuli on days 1 and 3 and with moderate stimuli on days 2 and 4. Results were classified in three categories: “awake” (flies that moved at least once during the 10 min that preceded stimulation), “responding” (flies that started moving within 1 min after stimulation and crossed the laser beam at least twice), and “not-responding” (flies that did not move or moved only once after stimulation).

Olfactory Conditioning. To test for aversive olfactory learning, groups of about 35 flies were conditioned in a barrel-type machine as described (12) by sequential exposure to two odors, octanol (OCT) and methylcyclohexanol (MCH), for 60 s with 45-s rest intervals between odor presentation. Exposure to the first odor was paired with electrical shocks (twelve 1.5-s pulses of 60 V dc with 5-s intervals between pulses). Flies were tested for odor avoidance by simultaneous exposure to both the shocked and control odors in a T-maze (13), either immediately ($t = 0$) or 2 h after conditioning. After 1 min, the flies trapped in either T-maze arm were scored. In each experiment, a reciprocal conditioning was run with different flies of the same genotype, by

applying electrical shocks during exposure to the second odor, to rule out bias from odor preference. The results are the mean of 6 to 11 independent experiments. The PI corresponds to an averaged and normalized probability of the correct answer, such that a 50:50 distribution (no memory) would yield $PI = 0$ and total avoidance of the shock-paired odor would yield $PI = 1$ (13).

Odor and Electrical Shock Avoidance. Both OCT or MCH are naturally slightly aversive to unconditioned flies. To test for olfactory acuity, the odor avoidance responses were quantified by giving naive flies a choice between odor and air in a T-maze. After 1 min, the flies were trapped in their respective tubes and counted. The PI was calculated as the normalized percentage of flies avoiding the odor. Two groups of the same stock were run successively, and the side of the test tube with odor was alternated. To remove odor traces from the previous run before each experiment, odor and fresh air, respectively, were aspirated through the relevant test tubes for 1 min in the absence of flies. Electrical shock avoidance of untrained flies was quantified by giving them a choice between “shock” and “no shock” for 1 min in a T-maze. Two barrels, identical to those normally used for conditioning, were connected to each other by a Plexiglas dish. Flies were trapped in the center of the compartment and allowed to choose for 1 min between the two barrels, one of which was electrified with pulses of 60 V DC identical to those normally used for conditioning. The PI was determined as for olfactory avoidance.

L-DOPA Treatment. Flies were incubated for 72 h at 25 °C on a piece of Whatman 3MM paper soaked with a solution of 5% (wt/vol) sucrose, 2% (wt/vol) yeast, and 10 mM sulforhodamine B (Sigma) containing or not containing (control) 1 mg/mL L-DOPA (Sigma). Before the behavior tests, flies were visually selected under CO₂ for sulforhodamine B staining in the abdomen to check for feeding and left to recover from anesthesia for at least 4 h in vials containing Whatman 3MM paper soaked with the same sucrose solution with or without L-DOPA.

Sugar Preference. Flies were starved for 21 h at 25 °C and 80% humidity. Their responses to sugar were quantified by giving them a choice between sucrose and an empty tube in a T-maze as described previously (14). After 1 min, the flies were trapped in their respective tubes and counted.

Phototaxis. Phototactic behavior was tested by mass and single-fly assays. For both assays, flies were raised in 12-h/12-h dim light/darkness conditions. Before the tests, 3- to 5-d-old adult female flies were selected under CO₂ and allowed to recover in fresh food vials for at least 3 h in darkness. The mass assay was carried out in a dark room with the countercurrent procedure described by Benzer (15). The apparatus consists of two rows of six relocatable horizontal tubes, one row proximal (labeled A1–6) and one distal (labeled B1–6) to the light source (a 4-V blue light diode was placed at a distance of 15 cm from the apparatus). Any tubes of each row can be connected to form double tubes. To start the experiment, 10 female flies were placed inside the A6–B1 double tube and brought to the distal end of tube B1 by gentle tapping. They were allowed to distribute freely for 1 min. Thereafter, swift sliding of the rows let tube A6 join tube B2 and tube A5 connect to tube B1. Again, the flies were gently tapped to the distal end of the two connected double tubes and then were allowed to distribute freely for 1 min. After six cycles, all the tubes were connected and the number of flies present in each double tube (e.g., A1–B1, A2–B2) was scored. In each experiment, the results were the mean of the scores from five trials. Data were statistically analyzed with a one-way ANOVA (Bonferroni-corrected). The single-fly phototaxis assay was performed using a T-maze system in which flies choose freely between an illuminated vial (12-V blue light) and a dark vial, as described by

Le Bourg and Buecher (16). Individual flies were transferred without anesthesia into a 1-mL syringe connected to the apparatus and gently pushed to the starting point of the maze. A trial ended when the fly reached one of the vials, and it was then recovered. The test was repeated five times with each fly ($n = 16$), and the percentage of photopositive choices was scored. Data were analyzed with the Wilcoxon signed-rank test, mean-tested against the reference constant (50% for equal distribution).

Electroretinograms. Electroretinograms (electrophysiological recordings from the surface of the eye) were performed on 3-d-old flies, attached to a holder by dental cement (Protemp). Borosilicate glass microelectrodes (Clark) filled with physiological saline solution (200 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 5 mM KCl) were placed in the thorax (reference electrode) or just beneath the cornea in the center of the eye (recording electrode, tip resistance $\sim 10\text{--}15\ \text{M}\Omega$). Recordings were performed at 19°C after at least 20 min of dark adaptation under dim red light. A lamp equipped with a mechanical shutter was used for stimulation.

Optomotor Assay. Visual movement responses of walking flies were measured as described (17). In this paradigm, tethered flies walked on an 8-mm Styrofoam sphere supported by a gentle stream of humidified air in the center of a rotating striped drum (20 black stripes, spatial wavelength = 18°). The rotations of the Styrofoam ball were recorded optoelectronically, providing a quantitative measure of the turning responses. Performance depends on the contrast in the environment and increases with increasing light intensity.

Visual Fixation and Orientation. Orientation toward a landmark was analyzed in the Buridan's paradigm (10, 18) on freely walking 5-d-old *Drosophila* with shortened wings. Single flies were confined to an elevated circular arena (8.5-cm diameter) surrounded by a water-filled moat and, beyond, a white cylindrical screen containing two opposing vertical black stripes. In this situation, WT flies spontaneously walk from one of these inaccessible landmarks to the other. Trajectories were recorded from above at 200 frames per second with a video-scanning device. The angular

deviation between fly trajectory and the approached target was measured every 0.2 s for 15 min. The curve for random orientation was calculated as described by Strauss and Pichler (10).

Detour Paradigm. Spatial orientation memory was tested in the detour paradigm as recently described (19). The device was comparable to that of the Buridan's test with a larger arena (16-cm diameter). As soon as the fly had traveled once between the two inaccessible vertical stripes and crossed the midline again, the landmarks disappeared and, simultaneously, a vertical distracter stripe appeared laterally at a 90° angle to the fly. After the fly approached for 1 s toward this landmark, the distracter stripe also disappeared and no stripes were visible thereafter. In this situation, a WT fly will turn back to the previous, still invisible, landmark, demonstrating memory of its anterior spatial orientation. Such a behavior was quantified by measuring the angle deviation between the actual trajectory of the fly and the direction of its initial target [further details are provided by Neuser et al. (19)]. Ten consecutive trials of at least 10 flies per genotype were recorded. Because some data were not normally distributed (Shapiro–Wilks W test), we used the Mann–Whitney U test for statistical analysis.

Food Intake Assay. For each determination, ten 3- to 5-d-old flies were starved for 1 h at 25°C before being incubated for 20 min on a piece of Whatman 3MM paper soaked with a solution of 5% (wt/vol) sucrose, 2% (wt/vol) yeast, and 10 mM sulforhodamine B supplemented or not with 1 mg/mL L-DOPA. They were frozen at -20°C for 2 h; then the heads were removed to prevent contamination by eye pigments, and the bodies were homogenized in 0.5 mL of PBS. After centrifugation at $17,000 \times g$ in an Eppendorf 5415 R microcentrifuge for 7 min at 4°C , the supernatant was collected, mixed with 0.2 mL of chloroform, and microcentrifuged again for 6 min. Optical density of the supernatant was determined with a NanoDrop (ThermoScientific) at 570 nm. Results are the mean of three independent determinations of each genotype.

1. Kress RE, Rubin GM (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* 38:135–146.
2. Friggi-Grelin F, et al. (2003a) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol* 54:618–627.
3. Li H, Chaney S, Roberts IJ, Forte M, Hirsh J (2000) Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 10:211–214.
4. Friggi-Grelin F, Iché M, Birman S (2003b) Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis* 35:175–184.
5. Budnik V, White K (1987) Genetic dissection of dopamine and serotonin synthesis in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 4:309–314.
6. Marini F III, Naeem A, Lapeyre JN (1993) An efficient 1-tube PCR method for internal site-directed mutagenesis of large amplified molecules. *Nucleic Acids Res* 21:2277–2278.
7. Vié A, Cigna M, Toci R, Birman S (1999) Differential regulation of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms by dopamine binding and cAMP-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 274:16788–16795.
8. Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581–585.
9. Birman S, Morgan B, Anzivino M, Hirsh J (1994) A novel and major isoform of tyrosine hydroxylase in *Drosophila* is generated by alternative RNA processing. *J Biol Chem* 269:26559–26567.
10. Strauss R, Pichler J (1998) Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 182:411–423.
11. Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J, Jackson FR (2005) Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci* 25:7377–7384.
12. Pascual A, Préat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
13. Tully T, Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 157:263–277.
14. Colomb J, Kaiser L, Chabaud MA, Préat T (2009) Parametric and genetic analysis of *Drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. *Genes Brain Behav* 8:407–415.
15. Benzer S (1967) BEHAVIORAL MUTANTS OF *Drosophila* ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:1112–1119.
16. Le Bourg E, Buecher C (2002) Learned suppression of photopositive tendencies in *Drosophila melanogaster*. *Anim Learn Behav* 30:330–341.
17. Strauss R, Schuster S, Götz KG (1997) Processing of artificial visual feedback in the walking fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 200:1281–1296.
18. Götz KG (1980) Visual guidance in *Drosophila*. *Basic Life Sci* 16:391–407.
19. Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R (2008) Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453:1244–1247.

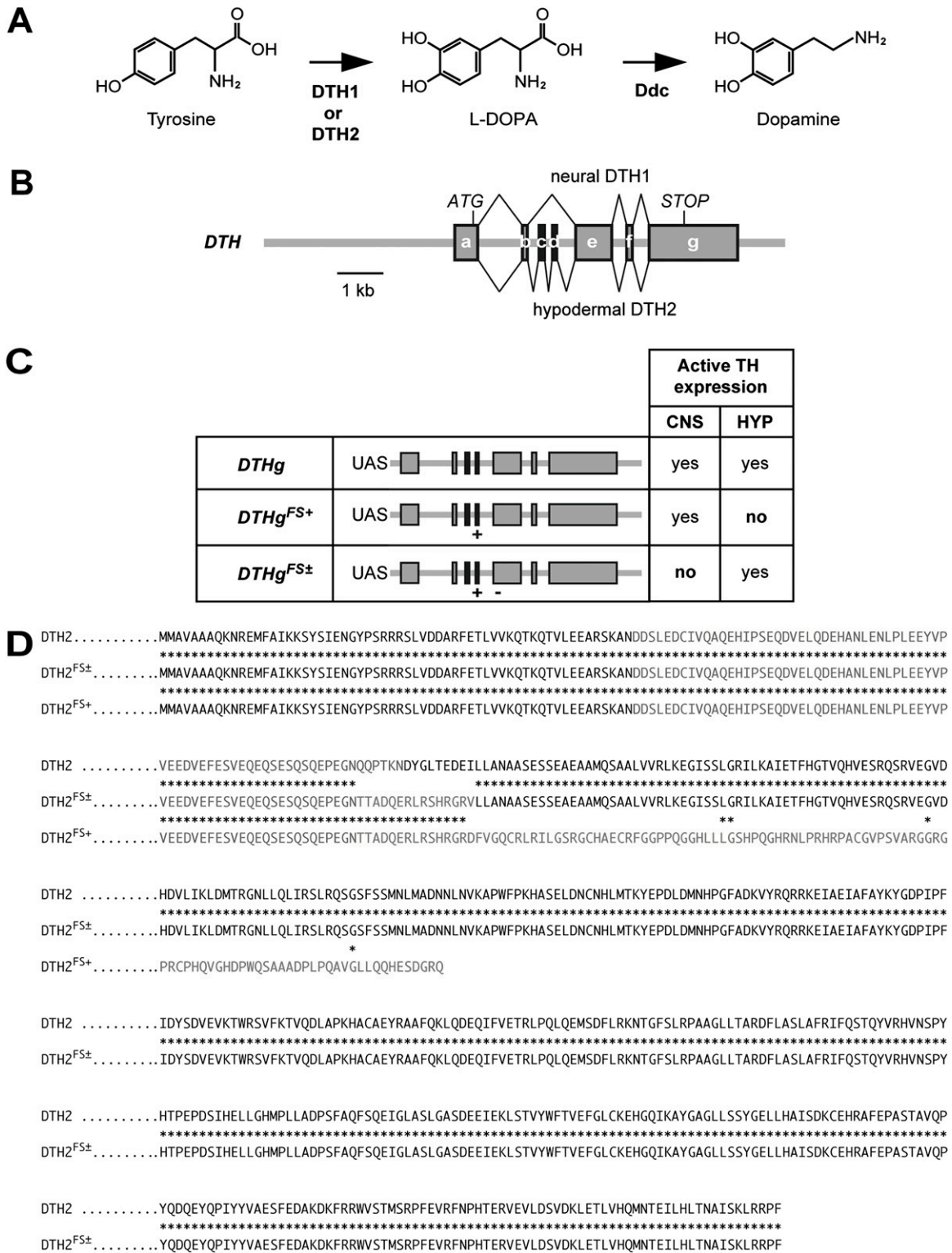


Fig. S1. Structures of the *DTH* gene, derived transgenes, and mutant isoforms. (A) DA biosynthesis pathway in *Drosophila*. Two tissue-specific isoforms of TH (neural DTH1 and nonneural DTH2) hydroxylate L-tyrosine to produce L-DOPA, which is decarboxylated in a second step to DA by Ddc. (B) Exon-intron structure and alternative splicing of the *DTH* gene (*DTH*). (a–g) Exons are represented as wide boxes separated by introns. Gray-filled boxes represent constitutive exons (a, b, e, f, and g), and black-filled boxes represent the two cassette exons (c and d). Exons c and d are skipped in the CNS but are normally spliced in nonnervous tissues, leading to expression of the neural DTH1 and hypodermal DTH2 isoforms, respectively. ATG and STOP represent the initiation and arrest of translation. (Scale bar: 1 kb.) (C) *UAS-DTH* transgenes. The 6.7-kb coding part of *DTH* with introns was fused downstream of GAL4-binding UASs. *DTHg*, WT *DTH*; *DTHg^{FS+}*, frameshift mutant with one supplementary base inserted in exon d; *DTHg^{FS±}*, frameshift mutant with one supplementary base in exon d and one compensatory deleted base in exon e. On the right is indicated in which tissue, either nervous (CNS) or hypodermal (HYP), these transgenes are expected to give an active or inactive form of TH after alternative splicing. (D) Amino acid sequence alignments of native DTH2 and mutant DTH2^{FS+} and DTH2^{FS±} isoforms. Amino acids of the acidic segment encoded by exons c and d are shown in green. The sequences generated by the mutagenesis and unrelated to *DTH* are in shown

Legend continued on following page

red. Stars indicate identical amino acids. The $DTH2^{FS+}$ cDNA contains an additional base at the end of exon d, which generates a frameshift mutation leading to translation of a truncated and inactive enzyme. The $DTH2^{FS\pm}$ cDNA contains both the additional base in exon d and a nearby compensatory base deletion in exon e, leading to translation of an active enzyme. Indeed, $DTH2^{FS\pm}$ only differs from the native $DTH2$ by a short 15-aa segment at the boundary of exons d and e. This segment is not conserved in vertebrate TH and is not essential for enzyme activity.

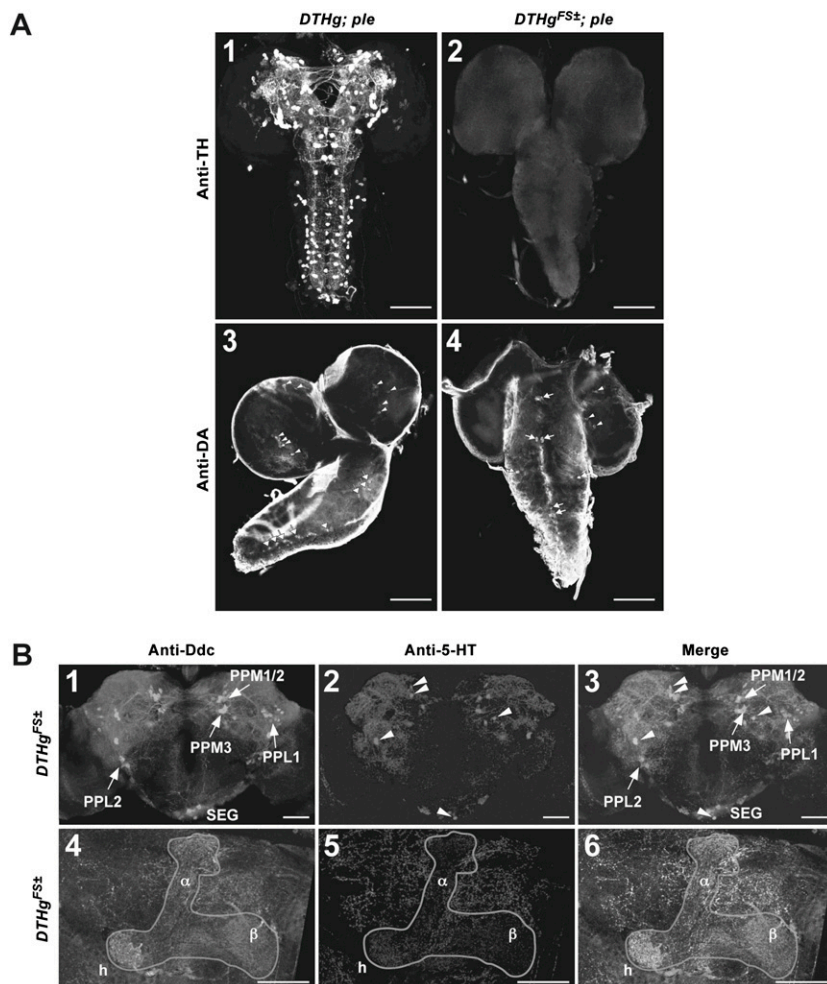


Fig. S2. Lack of TH does not hamper development of the brain dopaminergic system. (A) Anti-TH and anti-DA immunostaining on whole-mount third instar larval CNS of $DTHg$ - or $DTHg^{FS\pm}$ -rescued ple mutants. TH immunoreactivity was detected in the ventral nerve cord and larval brain of $DTHg; ple$ (1) but not of $DTHg^{FS\pm}; ple$ (2). In contrast, DA-immunopositive neurons could be observed in the larval nerve cord (arrows) and brain (arrowheads) of both $DTHg; ple$ (3) and $DTHg^{FS\pm}; ple$ (4). The number of DA-positive cells appeared reduced in the brain hemispheres of the DTH -deficient mutants compared with the $DTHg$ -rescued larvae. (B) Double immunostaining with anti- Ddc (green) and antiserotonin (magenta) in whole-mount adult brains of $DTHg^{FS\pm}$ -rescued ple mutants. (Right) Colocalizations appear in white in the merged pictures. (1–3) Regular pattern of dopaminergic neurons, which express Ddc but not DTH , can be recognized in the adult brain of $DTHg^{FS\pm}; ple$ flies. Specific dopaminergic clusters are indicated (1 and 3, arrows) that are distinct from Ddc -expressing serotonergic cells (2 and 3, arrowheads). (4–6) Magnification of the mushroom body lobe region reveals Ddc -positive and serotonin-negative projections on the vertical lobe (α), the tip of the horizontal lobes (β), and the heel (h). This indicates preservation of the characteristic innervation pattern of the adult mushroom body by dopaminergic neurons in the absence of DTH and DA. PPL, lateral posterior protocerebral neurons; PPM, medial posterior protocerebral neurons; SEG, subesophageal ganglion neurons. (Scale bars: 50 μ m).

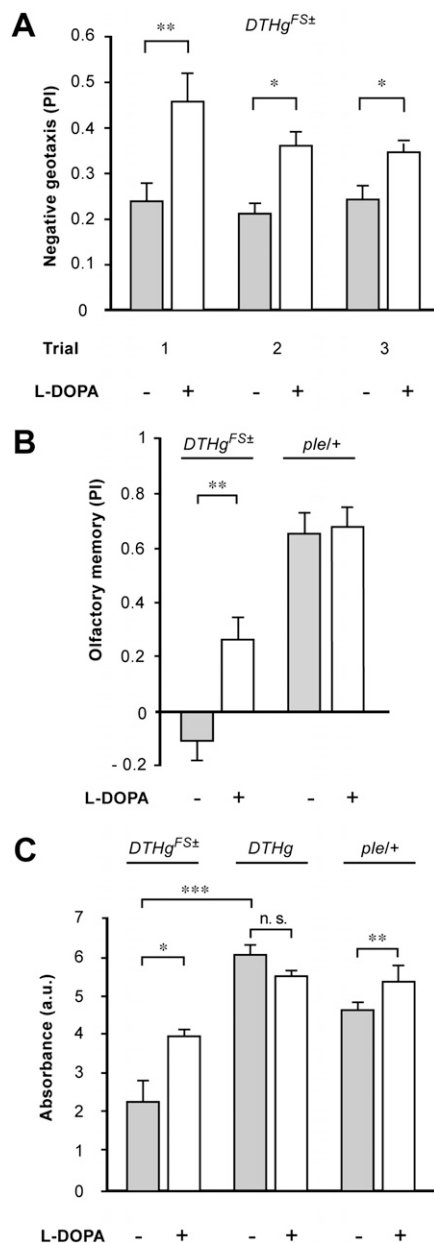


Fig. 56. L-DOPA rescue of disrupted behaviors in neural DA-deficient *Drosophila*. (A) Climbing abilities of 1-wk-old *DTHg^{FS±}; ple* flies fed for 3 d on sucrose alone (gray bars) or on sucrose plus 1 mg/mL L-DOPA (white bars), monitored by startle-induced negative geotaxis. Tests were repeated three times for each group (trials 1–3). The defect in negative geotactic behavior of *DTHg^{FS±}; ple* flies was significantly rescued by L-DOPA feeding at each trial (** $P < 0.02$ and * $P < 0.05$, Student's *t* test; $n = 13$). (B) Aversive olfactory learning. PI of flies was tested immediately ($t = 0$) after electrical shock training. (Left, bars) Feeding *DTHg^{FS±}; ple* flies for 3 d on sucrose plus 1 mg/mL L-DOPA significantly increased their conditioned avoidance of the aversive odor, compared with the same flies fed on sucrose alone (** $P = 0.015$, Student's *t* test; $n = 6$). (Right, bars) L-DOPA did not alter the learning performance of control *DTHg^{FS±}; ple/+* flies. (C) Food intake measured as light absorbance of ingested sulforhodamine B. a.u., arbitrary units. Starved flies were exposed for 20 min to a sucrose solution containing the colorimetric dye and then chloroform-extracted. DA deficient *DTHg^{FS±}; ple* eat one-third as much as *DTHg; ple*. This aphagic phenotype is rescued by L-DOPA feeding. Food intake by control *DTHg^{FS±}; ple/+* flies is also significantly improved by L-DOPA (Left), whereas *DTHg; ple* show no significant difference in the absence or presence of L-DOPA (Center). Results from three independent determinations. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, and *** $P < 0.005$, Student's *t* test.)

Table S1. Rescue of *ple* mutants to adult stage with a combination of dopaminergic drivers

	Pupae*		Adult female flies [†]		Adult male flies [†]	
	<i>Tb</i>	<i>Tb</i> ⁺⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i> ⁺⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i> ⁺⁺
<i>Ddc-GAL4</i> [§]	153	0	73	0	87	0
<i>TH-GAL4</i> [§]	374	123 (24.7)	254	0	287	0
Male <i>TH/Ddc-GAL4</i>	324	142 (30.5)	219	121 (35.6)	278	0
Female <i>TH/Ddc-GAL4</i>	94	55 (36.9)	76	56 (42.4)	45	32 (41.5)

Male or female *ple*/TM6B (*Tb*) flies with homozygous insertion of the indicated GAL4 drivers were mated to *ple*/TM6B (*Tb*) flies with homozygous insertion of the *UAS-DTHg* transgene. Rescue from *ple* late embryonic lethality was determined by scoring the relative number of homozygous *ple* (i.e., *Tb*⁺) pupae and adult flies in the progeny. Values indicate the number of progeny obtained in two to six independent crosses. Only the combination of one copy each of *TH-GAL4* and *Ddc-GAL4* (*TH/Ddc-GAL4* strain) led to rescue of *ple* to adult stage.

*Number of pupae scored 10 d after parent cross.

[†]Number of adult progeny scored from 12 to 22 d after parent cross.

[‡]Percentages of *Tb*⁺ progeny are in italics.

[§]For *Ddc-GAL4* and *TH-GAL4* alone, either male or female flies were used with similar results.

^{||}No *Tb*⁺ adult male flies were recovered with male GAL4 parents because *Ddc-GAL4* is inserted on the X chromosome.

Table S2. Rescue of *ple* by *DTH* gene frameshift mutants

	Adult male flies		Adult female flies	
	<i>Tb</i>	<i>Tb</i> ⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i> ⁺
<i>UAS-DTHg</i>	49	36 (42.3)	50	46 (47.9)
<i>UAS-DTHg</i> ^{FS+}	80	0	70	0
<i>UAS-DTHg</i> ^{FS±}	52	37 (41.6)	53	31 (36.9)

Female *ple*/TM6B (*Tb*) flies with homozygous insertion of the *Ddc-GAL4:TH-GAL4* double driver were mated to male *ple*/TM6B (*Tb*) flies with homozygous insertion of the indicated *UAS* transgene. Rescue from *ple* late embryonic lethality was determined by scoring the relative number of homozygous *ple* (i.e., *Tb*⁺) adult flies in the progeny. Values indicate the number of progeny obtained in two to three independent crosses.

*Percentages of *Tb*⁺ progeny are in italics.

Table S3. Determination of DA levels in brain extracts by HPLC: Data from HPLC at +500-mV oxidation potential (n = 3)

Strain	"DA" (pg/brain)	SEM
<i>w</i> ¹¹¹⁸	52.0	5.5
<i>DTHg; ple</i>	49.0	3.1
<i>DTHg</i> ^{FS±} ; <i>ple</i>	7.5	1.0

A standard HPLC analysis for DA performed with the fully oxidizing +500-mV electrochemical potential indicates that DA levels in the *DTHg*^{FS±}; *ple* strain are reduced to ~15% of WT levels (but see Table S4) and that the *DTHg; ple* line shows fully restored levels of DA.

Table S4. Determination of DA levels in brain extracts by HPLC: Relative "DA" peak area at +420-v. +500 mV-detector potential (n = 3)

Strain	Relative peak area	SEM
<i>w</i> ¹¹¹⁸	0.43	0.07
<i>DTHg; ple</i>	0.46	0.01
<i>DTHg</i> ^{FS±} ; <i>ple</i>	1.05	0.18

To determine whether the reduced peak in *DTHg*^{FS±}; *ple* was authentic DA, the HPLC was repeated using a reduced detector potential of +420 mV, near the half-maximal detector sensitivity for DA. This analysis showed that the residual peak in the *DTHg*^{FS±}; *ple* strain is unaffected by the reduced detector potential (relative peak area = 1.05), in contrast to *w*¹¹¹⁸ and *DTHg; ple* flies. Thus, the residual peak in the neural TH-deficient strain is largely, if not totally, a non-DA contaminant. This shows that the *DTHg*^{FS±}; *ple* brain extract lacks detectable DA.



Movie S1. Proboscis extension reflex is normal in DA-deficient *Drosophila*. Representative movie successively showing two presentations of water (with a soaked standard cotton swab) followed by two presentations of 5% (wt/vol) sucrose to the foreleg tarsi of a female *DTHg^{FS±}; ple* fly. Only the sucrose solution triggers proboscis extension as in WT flies.

Movie S1