

Thèse de Doctorat

Anne-Gaëlle CORBILLE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie

Spécialité : Neurosciences

Unité de recherche : INSERM UMR 913

Soutenue le 25/10/2016

Thèse N° : (10)

Détection et caractérisation de l' α -synucléine dans le système nerveux entérique en conditions physiologiques et dans la maladie de Parkinson

Président du jury :	Denis HERVE , Directeur de recherche, INSERM U839, Paris
Rapporteurs :	Denis HERVE , Directeur de recherche, INSERM U839, Paris Wassilios MEISSNER , Professeur des université-Praticien hospitalier, Université de Bordeaux
Examineurs :	Luc BOUSSET , Chargé de recherche, CNRS Gif-sur-Yvette
Directeur de Thèse :	Pascal DERKINDEREN , Professeur des université-Praticien hospitalier, Université de Nantes
Co-encadrant de Thèse :	Franck LETOURNEL , Maître de conférence, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	Michel NEUNLIST , Directeur de recherche, INSERM U913, Nantes

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail, le Pr Wassilios Meissner et Denis Hervé d'en être les rapporteurs et Luc Bousset de l'examiner.

Je remercie Michel Neunlist de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de ses conseils, de sa sympathie et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions.

Un grand merci à mon directeur de thèse Pr Pascal Derkinderen de m'avoir confié ce travail de thèse, d'avoir soutenu, dirigé et valorisé mon travail pendant ces 3 années de labo. Merci pour tes qualités scientifiques et humaines. C'était un plaisir de travailler avec toi.

Je remercie également le Dr Franck Letournel de m'avoir laissé ouvertes les portes de son laboratoire de neuropathologie à Angers. Merci pour tes conseils, ta rigueur de travail et ta disponibilité. Je ne manque pas de remercier Catherine Dumez et Isabelle Viaud de m'avoir accueillie à leur paillasse, pour leur gentillesse et leur aide précieuse.

Je remercie particulièrement Cécile Préterre, qui a grandement contribué à ce travail lors de son stage de Master 2, pour sa motivation et la qualité de son travail.

Je remercie Thomas Beach, du Banner Sun Health Research Institute (Arizona) qui a assuré un rôle central dans l'élaboration et la réalisation du projet collaboratif d'immunohistochimie.

Un grand merci au personnel du CIC de neurologie, aux gastroentérologues et aux neurologues du CHU de Nantes et aux membres de l'U913 ayant permis l'élaboration de la biocollection des biopsies. Pour n'en citer que quelques uns merci à Thibaud Lebouvier, Laurene Leclair-Visonneau, Tiphaine Rouaud, Emmanuel Coron, Hélène Pouclet, Thomas Clairembault, David Devos...

Je remercie chaleureusement les patients qui ont accepté de participer aux études cliniques de l'U913.

Je remercie également l'Ecole de l'Inserm-Liliane Bettencourt pour avoir apporté un soutien scientifique et financier à la réalisation de cette thèse.

Un grand merci aux membres actuels et passés de l'unité 913 pour leur sympathie et bonne humeur. Un merci chaleureux à Malvyne Derkinderen qui a réussi à me supporter dans son bureau, avec qui j'ai eu la chance d'échanger mes déboires expérimentaux contre des conseils avisés ! Merci ++ à mes collègues du bureau 418, de la paillasse des blotteurs, aux Derkin'teams (Camille, DJ Gaga, Cécile, Tom, Arnaud, Thomas, Alice, et aux « extra » (coucou Jacques)) pour leur sympathie, bonne humeur et blagues à couper le souffle. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Merci aux chercheurs, ITA, post-doc, thésards et étudiants que j'ai eu la chance de rencontrer et qui assurent une ambiance chaleureuse dans les locaux du 4eme et de l'«Embuscade».

Merci à mes proches, ma famille, mes amis et mes collègues pour leur soutien au quotidien.

Un immense merci à Sylvain, pour son amour et son soutien depuis toutes ces années. Merci de m'avoir comprise et soutenue malgré les nombreuses heures que j'ai consacrées à l'alpha-synucléine !

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
Table des matières	4
Abréviations	8
Contexte et objectifs du travail de thèse	9
Rappels bibliographiques.....	11
1. La maladie de Parkinson (MP) est une maladie diffuse et évolutive	11
1.1 Généralités sur la MP	11
1.2 Des symptômes non moteurs variés et précoces	12
1.3 Neuropathologie de la MP.....	14
1.3.1 La pathologie de Lewy : les corps et neurites de Lewy	14
1.3.2 La perte neuronale	16
1.4 Distribution et progression temporelle de la pathologie de Lewy	17
1.4.1 Les lésions encéphaliques : la classification de Braak.....	17
1.4.2 Au-delà du tronc cérébral : une maladie du système nerveux autonome	19
1.4.3 Cas particuliers des sujets avec corps de Lewy incidents	20
1.4.4 Des corrélations clinico-neuropathologiques.....	21
1.4.5 Controverses sur l'hypothèse de Braak et perspectives	22
2. La MP une synucléinopathie	24
2.1 La découverte de l' α -synucléine	24
2.2 L' α -synucléine : élément central dans la physiopathologie de la MP	24
2.3 Localisation	25
2.4 Des fonctions physiologiques multiples	25

2.5	Structure de l'α-synucléine.....	26
2.5.1	Séquence primaire	26
2.5.2	Modifications post-traductionnelles de l'α-synucléine	27
2.5.3	Conformation / Structure native.....	28
2.6	Formes pathologiques de l'α synucléine	31
2.6.1	Les corps de Lewy.....	31
2.6.2	Agrégation de l'α-synucléine : seeding	33
2.6.3	Des capacités de diffusion (« spreading »).....	36
2.6.4	Neurotoxicité de l'α-synucléine	37
3	Atteinte du système nerveux entérique au cours de la MP	38
3.1	Symptômes digestifs dans la MP	38
3.2	Bases anatomique et fonctionnelle de l'innervation gastro-intestinale.....	39
3.2.1	Morphologie	39
3.2.2	Neuromédiateurs du SNE	42
3.2.3	Les neurones entériques	44
3.2.4	Autres populations cellulaires	47
3.3	Corrélations clinico-pathologiques de la constipation dans la MP.....	48
3.3.1	Physiopathologie de la constipation dans la MP	48
3.3.2	La pathologie de type Lewy dans le SNE est fréquente	48
3.3.3	Perte neuronale et modification du phénotype neurochimique SNE	50
3.4	L'α-synucléine entérique un biomarqueur de la maladie ?	52
3.4.1	A la recherche d'un biomarqueur précoce dans la MP.....	52
3.4.2	L'α-synucléine entérique dans les biopsies coliques : un biomarqueur de la MP performant ?	53

3.4.3	L'α-synucléine entérique : un biomarqueur accessible du vivant du patient et analysable à grande échelle ?	56
	RESULTATS	58
1	Phénotype neurochimique du SNE dans la MP.....	58
	ARTICLE 1. Appraisal of the Dopaminergic and Noradrenergic Innervation of the Submucosal Plexus in PD.....	58
2	L'α-synucléine entérique un biomarqueur de la MP ?	68
2.1	Apport de la détection de l'α-synucléine entérique dans les biopsies coliques incluses en paraffine	68
2.1.1	Expression de l'α-synucléine phosphorylée sur la Ser129 dans des biopsies coliques incluses en paraffine dans la MP et chez des témoins	68
2.1.2	Evaluation des méthodes d'IHC visant à détecter la synucléinopathie de type Lewy dans les biopsies gastro-intestinales	74
	ARTICLE 2. Evaluation of α-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies	74
2.1.3	Evaluation des méthodes d'IHC visant à détecter la synucléinopathie de type Lewy dans les échantillons coliques issues d'autopsie	85
	ARTICLE 3. Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological A-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects (Beach et al., 2016).....	85
2.1.4	Evaluation de la prévalence de la STL à partir de la méthode d'IHC optimale précédemment identifiée dans des biopsies coliques de patients parkinsoniens	97
2.2	Apport de l'analyse biochimique de l'α-synucléine dans le SNE.....	99
2.2.1	Optimisation de la détection de l'α-synuléine endogène par western blot dans le SNE.....	100

ARTICLE 4. Optimizing Western Blots for the Detection of Endogenous α -Synuclein in the Enteric Nervous System	100
2.2.2 Quantification et caractérisation biochimique de l' α -synucléine dans le SNE en conditions physiologiques et dans la MP.....	110
3 L' α -synucléine entérique physiologique existe-t-elle sous forme tétramérique ?.....	116
ARTICLE 5. Cross-linking for the analysis of α -synuclein in the enteric nervous system	116
DISCUSSION.....	145
1 Phénotype neurochimique du SNE au cours de la MP	145
2 α -synucléine entérique un biomarqueur de la MP ?.....	148
2.1 Vers une nouvelle définition de la MP	148
2.2 Apport de l'analyse IHC de l' α -synucléine dans les biopsies coliques	149
2.3 Apport de l'analyse biochimique de l' α -synucléine dans les biopsies coliques	153
3 L' α -synucléine entérique a-t-elle des propriétés différentes de l' α -synucléine cérébrale?.....	155
CONCLUSION	158
ARTICLES DE REVUE.....	159
BIBLIOGRAPHIE.....	169

Abréviations

2D	bidimensionnelle	kDa	kiloDalton
5-HT	5-hydroxytryptamine	MP	maladie de Parkinson
BCA	bicinchoninic acid	ME	microscope électronique
Calb	calbindine,	NETF	NaCl, EDTA, Tris-HCl, NaF
CCK	cholecystokinine,	NPY	neuropeptide Y.
CGRP	calcitonin gene-related peptide	PGP9.5	protein gene product 9.5
DAB	3 3'-diaminobenzidine	P-Ser129	phospho-Sérine-129
DBH	dopamine beta-hydroxylase	PFA	paraformaldéhyde
DCL	démence à corps de Lewy	PM	poids moléculaire
DSP	dithiobis [succinimidylpropionate]	STL	synucléinopathie de type Lewy
DTT	dithiothréitol	SNE	système nerveux entérique
Dyn	dynorphine	SNC	système nerveux central
ENK	enképhaline	SP	substance P
HE	hématéine éosine	TH	Tyrosine hydroxylase
GRP	gastrin releasing peptide	UTC	urée-thiourée-CHAPS

Contexte et objectifs du travail de thèse

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire associée à la présence d'agrégats intracellulaires d' α -synucléine (pathologie de Lewy) dans les neurones survivants. Il est désormais clairement établi que les lésions neuropathologiques de la maladie ne se limitent pas à la substance noire mais touchent de nombreuses autres régions du système nerveux central et des systèmes nerveux périphériques autonomes. Alors que l'atteinte de la voie dopaminergique nigro-striée est responsable des signes moteurs de la maladie (bradykinésie et hypertonie), l'atteinte extra-nigrale est vraisemblablement en lien avec la survenue des symptômes non moteurs de la maladie et reflète la capacité de propagation de la maladie.

Au-delà de la simple caractérisation anatomopathologique, l' α -synucléine joue très vraisemblablement un rôle clef dans la physiopathologie de la maladie puisqu'elle permettrait la transmission trans-synaptique du processus pathologique par un mécanisme "prion-like" (Goedert et al., 2014). La propagation des lésions neuropathologiques semble suivre un schéma anatomique caudo-rostrale, allant du bulbe olfactif et du système nerveux entérique au cerveau (Del Tredici and Braak, 2016). Pour autant, le schéma de propagation précis est encore sujet à débat et la participation d'une vulnérabilité cellulaire au processus pathologique n'est pas exclue.

Le système nerveux entérique (SNE) est un système neuro-glial complexe, intégratif, en relation proche avec le système nerveux central (SNC), notamment par le nerf vague. Des travaux récents dont certains réalisés au laboratoire ont montré d'une part que le SNE était accessible et analysable par une biopsie colique de routine du vivant du patient et d'autre part que le SNE était le siège du processus pathologique de la MP (Beach et al., 2010; Braak et al., 2006a; Derkinderen et al., 2011). Le SNE pourrait constituer une « fenêtre » sur le SNC, favorisant la détection précoce de la MP, et offrant l'opportunité de développer des traitements visant à ralentir la diffusion de la maladie.

Les objectifs généraux de mon travail de thèse s'articulent autour de trois axes.

Une première partie s'inscrit dans une meilleure compréhension de la physiopathologie des symptômes gastro-intestinaux et a pour objectif de poursuivre la caractérisation de l'atteinte neurochimique du SNE au cours de la MP (article n°1).

Un deuxième axe porte sur l'évaluation du SNE en tant que source de biomarqueurs diagnostiques de la MP accessible du vivant du patient. Nous avons cherché à optimiser la détection de la synucléinopathie de type Lewy (STL) dans les biopsies coliques de patients effectuées en « routine » et à évaluer ses performances diagnostiques vis-à-vis de la maladie. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser deux approches complémentaires, une immunohistochimique (IHC) (articles 2 et 3) et une biochimique (article 4).

Enfin afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'initiation et la diffusion de la maladie, nous avons cherché à déterminer les propriétés natives de l' α -synucléine du SNE et de les comparer à celle du SNC (article 5).

Rappels bibliographiques

1. La maladie de Parkinson (MP) est une maladie diffuse et évolutive

1.1 Généralités sur la MP

La MP est la 2ème maladie neurodégénérative en terme de fréquence après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 0,3 % de population dans les pays industrialisés, avec une prévalence qui augmente de façon exponentielle avec l'âge, passant de 1 % chez les personnes de plus de 60 ans à 4 % chez les plus de 80 ans (Kim, 2013; Olanow et al., 2009). La MP est le plus souvent sporadique, vraisemblablement d'origine multifactorielle. Des facteurs de prédisposition génétiques (Nalls et al., 2014) et l'exposition à certains facteurs environnementaux comme les pesticides sont associés à un risque accru de développer la maladie (Noyce et al., 2012).

Elle a été décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson initialement sous le terme de « paralysie tremblante » et se présente cliniquement par un syndrome parkinsonien, comprenant classiquement akinéto-hypertonie et tremblement de repos. Cette atteinte motrice, plus spécifiquement la rigidité et l'akinésie, est liée à la perte en neurones dopaminergiques de la substance noire. On estime que les manifestations motrices surviennent chez les malades lorsqu'au moins 30 % des neurones dopaminergiques ou 50-70 % des terminaisons dopaminergiques striatales ont disparu (Hornykiewicz, 1998; Uhl et al., 1985).

Le diagnostic est en pratique essentiellement clinique, reposant sur un faisceau d'arguments (Postuma et al., 2015). Le diagnostic de certitude reste neuropathologique et repose sur la constatation d'une perte neuronale de la substance noire pars compacta associées à la présence dans les neurones survivants d'inclusions protéiques insolubles, les corps ou les prolongements de Lewy lorsqu'elles sont respectivement dans le cytoplasme ou dans les prolongements neuronaux (Del Tredici and Braak, 2012; Dickson et al., 2009).

Les maladies neurodégénératives peuvent être classées selon différents critères. D'une part selon le phénotype clinique, qui est intimement lié à la topographie des lésions dans le système

nerveux. La MP fait partie des maladies du mouvement comportant un syndrome parkinsonien, au même titre que la démence à corps de Lewy, la paralysie supranucléaire progressive ou l'atrophie multisystématisée. Ces maladies sont également classées selon une approche plus physiopathologique par le type de protéines impliquées dans les lésions. En effet la majorité des maladies neurodégénératives est associée à une accumulation anormale d'une ou plusieurs protéines (Kovacs, 2016). On peut alors distinguer au sein des maladies du mouvement :

- les synucléinopathies dans lesquelles l' α -synucléine s'accumule sous forme agrégée, auxquelles appartiennent la MP, la démence à corps de Lewy, l'atrophie multi-systématisée et entité plus rare l'hypotension orthostatique idiopathique ;
- et les tauopathies auxquelles appartiennent entre autres la maladie d'Alzheimer et la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale, puisqu'associées à une accumulation anormale de la protéine Tau. Dans la MP et la démence à corps de Lewy diffus (DCL), l' α -synucléine s'agrège dans les neurones et participe à la composition des corps de Lewy alors que dans l'atrophie multisystématisée, l' α -synucléine s'agrège dans les oligodendrocytes, sans former de corps de Lewy.

1.2 Des symptômes non moteurs variés et précoces

Outres les symptômes moteurs liés à la perte de l'innervation dopaminergique nigro-striatale, les patients parkinsoniens présentent d'autres manifestations cliniques, ne s'améliorant que peu ou pas avec la substitution dopaminergique et qui sont vraisemblablement en lien avec une atteinte plus diffuse de la maladie, extra-nigrale. Les symptômes non moteurs qui sont plus fréquemment rapportés chez les patients parkinsoniens que chez des patients témoins appariés en âge sont multiples : les symptômes de dysautonomie cardiovasculaire, digestive, ou de l'appareil génito-urinaire, les troubles cognitifs, l'anxiété et la dépression, les hallucinations, les troubles sensitifs, les troubles du comportement en sommeil paradoxal, l'hyposmie. La prévalence de ces symptômes augmente avec la durée d'évolution de la maladie et ils ont un impact majeur sur la qualité de vie des patients (pour revue Chaudhuri et al., 2006; Martinez-Martin et al., 2011).

De façon intéressante, certains symptômes non moteurs peuvent survenir précocement dans l'évolution de la maladie et ce avant même l'apparition du syndrome parkinsonien moteur, ce qui a conduit au concept de maladie de Parkinson prodromale. L'hyposmie, la constipation et les troubles du comportement en sommeil paradoxal en font partie (Abbott et al., 2001; Chaudhuri et al., 2006; Ponsen et al., 2004; Postuma et al., 2012; Schenck et al., 1996). On estime que ces symptômes peuvent apparaître 10 à 20 ans avant le syndrome parkinsonien moteur (Figure 1)(Kalia and Lang, 2015). D'autres symptômes sont de survenue plus tardive dans l'évolution de la maladie, tels que les complications du traitement dopaminergiques (fluctuations motrices, dyskinésie), les troubles cognitifs, les hallucinations, et l'instabilité posturale.

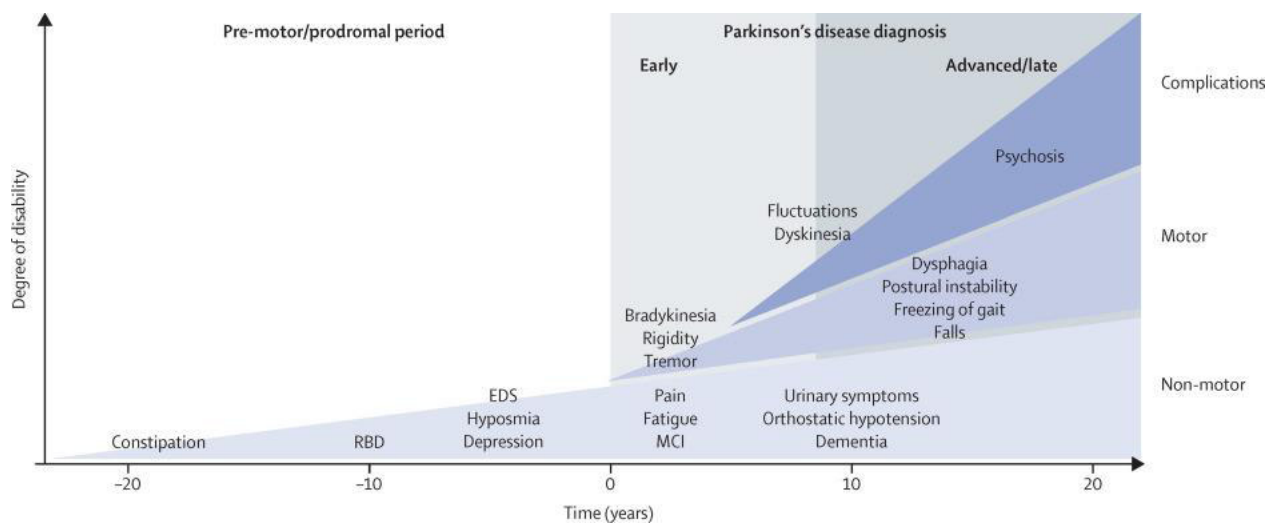


Figure 1. Symptômes cliniques et progression de la MP au cours du temps (Kalia and Lang, 2015)

Le diagnostic de la maladie de Parkinson a lieu lorsque les symptômes moteurs apparaissent (temps=0 ans), mais il peut être précédé d'une phase pré-motrice ou prodromale de 20 ans ou plus. Cette phase prodromique est caractérisée par certains symptômes non moteurs. D'autres symptômes non-moteurs se développent après le diagnostic et à la progression de la maladie, entraînant un handicap clinique : les symptômes moteurs axiaux, tels que l'instabilité posturale, le freezing à la marche, la psychose et les complications à long terme de la thérapie dopaminergique. EDS = somnolence diurne excessive. MCI = déficience cognitive légère. RBD = trouble du comportement en sommeil paradoxal.

1.3 Neuropathologie de la MP

La MP est une maladie neurodégénérative caractérisée sur le plan neuropathologique par la perte de neurones dopaminergiques de la substance noire et par la présence d'inclusions intraneuronales, décrite sous le terme pathologie de Lewy (Del Tredici and Braak, 2016; Dickson et al., 2009).

1.3.1 La pathologie de Lewy : les corps et neurites de Lewy

Description

La première description des inclusions neuronales caractéristiques de la MP dans le cerveau de patients atteints de la « paralysie tremblante » remonte à 1912 par Lewy, dont le nom sera utilisé pour décrire les corps et les neurites de Lewy lorsque les inclusions sont respectivement situées dans le corps cellulaire et au niveau des neurites (Goedert et al., 2013; Lewy, F, 1912). Ils ont été mis en évidence initialement par des colorations standard de type éosine-hématoxyline dans le noyau dorsal du nerf vague (tronc cérébral), le noyau basal de Meynert, le globus pallidus, le thalamus, puis rapidement dans d'autres régions cérébrales, la substance noire, les régions limbiques, corticales et en dehors du SNC.

Deux types de ces inclusions intracytoplasmiques neuronales ont été décrits : le corps de Lewy classique du tronc cérébral ou de la substance innominée, ainsi dénommé par Tretiakoff (Tretiakoff, 1919), volumineuse (30-40 μm) inclusion sphérique éosinophile à centre hyalin et à couronne périphérique pâle et le corps de Lewy cortical, plus petit (10-20 μm), mal défini et homogène, refoulant le noyau de petits neurones. En microscopie électronique, les corps de Lewy sont composés d'un centre dense osmiophile et de fibrilles périphériques radiaires de 8 à 10 nm de large (Duffy PE, 1965). Ils sont les marqueurs neuropathologiques des maladies à corps de Lewy, dont les mieux caractérisées sont la MP et la démence à corps de Lewy (Gómez-Tortosa et al.), bien qu'ils puissent aussi être vus occasionnellement lors d'autres affections neurodégénératives, telles la maladie d'Alzheimer (Hansen et al., 1990; Lippa et al., 1998), le syndrome de Down (Lippa et al., 1999), la neurodégénérescence associée à un déficit en pantothénate kinase (Arawaka et al., 1998), la maladie de Gaucher (Wong et al., 2004) et même

chez des individus cliniquement sains, appelés dans ce cas des sujets avec corps de Lewy incidents (ou corps de Lewy de découverte fortuite) (Braak et al., 2003; Jellinger, 2009).

Composition des corps de Lewy

De multiples protéines ont été trouvées dans les corps de Lewy, notamment l'ubiquitine, l' α -B-cristalline et les trois sous-types de neurofilaments. La protéine qui les caractérise le plus est cependant l' α -synucléine (Spillantini et al., 1997), principalement sous forme phosphorylée et agrégée (Anderson et al., 2006; Fujiwara et al., 2002). Elle est présente dans les corps de Lewy et dans les prolongements des neurones affectés, même s'ils ne comportent apparemment pas de corps de Lewy.

La technique de choix pour mettre en évidence la pathologie de Lewy est devenue depuis plusieurs années l'immunomarquage de l' α -synucléine qui est plus sensible. Elle permet notamment de mettre en évidence plus facilement les corps de Lewy corticaux dépourvu du halo clair en coloration HE (Gómez-Tortosa et al.). L'immunomarquage de l' α -synucléine permet de visualiser ce que l'on peut appeler la synucléinopathie de type Lewy (STL). Il peut révéler des inclusions neuronales d'aspects morphologiques multiples, comme illustrés dans la Figure 2 extraite de (Goedert et al., 2013). L'agrégation de l' α -synucléine semble débiter préférentiellement dans la partie distale de l'axone au niveau des terminaisons synaptiques puis remonte vers le soma où se forme préférentiellement les corps de Lewy (Kanazawa et al., 2012).

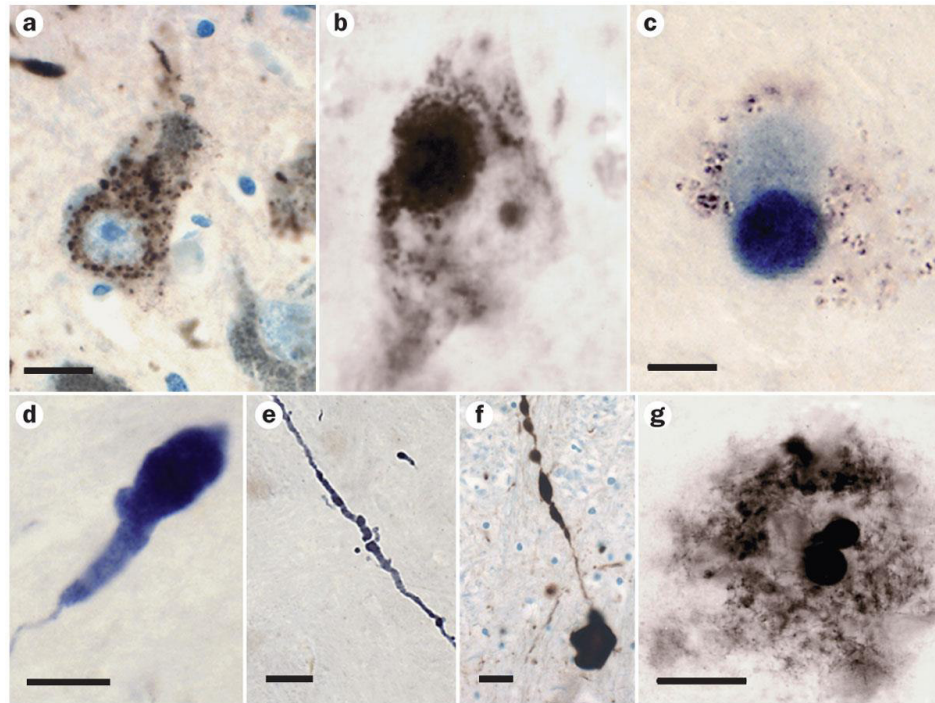


Figure 2. Immunoréactivité de l' α -synucléine de la pathologie de Lewy.

a | Inclusions ponctuelle dans des neurones dopaminergiques de la substance noire, qui précède probablement la formation de corps de Lewy.

b | Fibres moussues avec corps de Lewy dans la corne d'Ammon de l'hippocampe (CA4)

c | Corps de Lewy dans les cellules dopaminergiques de la substance noire. Corps pale (bleu clair) et corps de Lewy (bleu foncé) dans une cellule contenant de la neuromélanine.

d | en forme de club, **e |** filiforme and **f |** neurites de Lewy variqueux

g | plaque de Lewy comprenant un cœur extracellulaire de protéine bêta-amyloïde, entouré par des neurites dystrophiques immunoréactifs pour l' α -synucléine

Coupes en paraffine immunomarquées pour l' α -synucléine et avec la coloration argentique de Campbell-Switzer pour g. Barres d'échelle 20 μ m.

Figure adaptée du livre de Braak, H. & Del Tredici, K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease (Braak and Del Tredici, 2009)

1.3.2 La perte neuronale

La dégénérescence de la substance noire au cours de la MP a été bien documentée. Elle est associée à une dépigmentation du mésencéphale, les neurones dopaminergiques contenant de nombreux pigments de neuromélanine (Ehringer et Hornykiewicz, 1960). La perte neuronale

moyenne en *post mortem* est estimée à environ 60 % dans les zones ventrales et de 40 % dans les zones dorsales de la substance noire (German et al., 1989), associée à une diminution de la taille des corps cellulaires pigmentés du mésencéphale (Ma et al., 1997). La perte neuronale est inhomogène et prédomine dans certaines zones de la substance noire, elle est plus sévère dans sa partie médio-caudale que rostro-latérale (Damier et al., 1999). Les extrapolations clinico-pathologiques des études récentes s'accordent pour dire que les symptômes moteurs de la MP apparaissent lorsque la mort neuronale atteint 30 % des neurones dopaminergiques, (60 % dans les études les plus antérieures) qui correspond à une dénervation striatale plus marquée de l'ordre de 50 à 70 %. (Cheng et al., 2010; Fearnley and Lees, 1991; Greffard et al., 2006; Ma et al., 1997). Tout récemment une équipe a évaluée la perte neuronale nigrale *in vivo* par imagerie moléculaire TEP utilisant un ligand affin pour la neuromélanine, et retrouve une diminution du volume de fixation d'environ 30 % chez les parkinsoniens par rapport aux témoins (Hansen et al., 2016).

En dehors de la substance noire, la perte neuronale a été mise en évidence associée à la pathologie de Lewy dans **certains noyaux du tronc cérébral** : le locus coeruleus-subcoeruleus noradrénergique, des noyaux cholinergiques, le noyau basal cholinergique de Meynert (Zarow et al., 2003), le noyau dorsal du vague (Gai et al., 1992), le noyau pédonculopontin (Hirsch et al., 1987), le noyau d'Edinger-Westphal et le noyau sérotoninergique du raphe (Jellinger, 1991).

La perte neuronale est également rapportée dans le **système nerveux périphérique autonome** (Cersosimo and Benarroch, 2012a) : les ganglions paravertébraux sympathiques et les fibres noradrénergiques **cardiaques** (Orimo et al., 2007, 2008). De plus au niveau du noyau olfactif antérieur, la pathologie est associée à une perte neuronale (Pearce et al., 1995).

1.4 Distribution et progression temporelle de la pathologie de Lewy

1.4.1 Les lésions encéphaliques : la classification de Braak

De nombreux travaux ont été réalisés par des anatomopathologistes pour essayer de déterminer un système de cotation visant à classer la sévérité et la topographie des lésions de la

maladie de Parkinson, ie de la pathologie de Lewy (Braak et al., 2003; Dickson et al., 2009; McKeith et al., 2005; Saito et al., 2004).

La classification de l'équipe de Heiko Braak en Allemagne publiée en 2003, est très largement citée. Cette équipe a émis l'hypothèse que les lésions intra-neuronales évoluaient de façon séquentielle, débutant à des sites de prédisposition prédéfinis et se propageaient de façon prédictive et séquentielle aux régions cérébrales vulnérables. Ils ont fait une analyse anatomopathologique d'autopsies cérébrales de 41 patients parkinsoniens et 69 sujets indemnes cliniquement de pathologie neurodégénérative mais ayant une atteinte du noyau dorsal du nerf vague, identifiés comme les sujets ayant des corps de Lewy incidents (et 58 témoins appariés en âge). Ils proposent un pattern de progression temporelle et spatiale de la pathologie de Lewy qui respecterait des voies anatomiques. D'après leurs constatations, celle-ci débiterait dans les bulbes olfactifs, les noyaux olfactifs antérieurs et dans le noyau dorsal du nerf vague (stade 1). La pathologie de Lewy s'étendrait de façon caudo-rostrale au locus coeruleus et aux noyaux du raphé (stade 2), puis gagnerait le mésencéphale avec atteinte de la substance noire (stade 3), du noyau basal de Meynert et un peu de l'amygdale. C'est à partir de ce stade que les manifestations cliniques motrices débutent. Au stade 4, ils notent une atteinte massive de l'amygdale et une atteinte du mésocortex temporal. Au stade 5 les lésions s'étendent aux aires corticales associatives jusqu'à l'ensemble du néocortex (stade 6) (Braak et al., 2003) (Figure 3). D'après les auteurs, le pattern de distribution de la pathologie de Lewy est plus important à prendre en compte que l'intensité de la synucléinopathie, pour classer la sévérité des lésions.

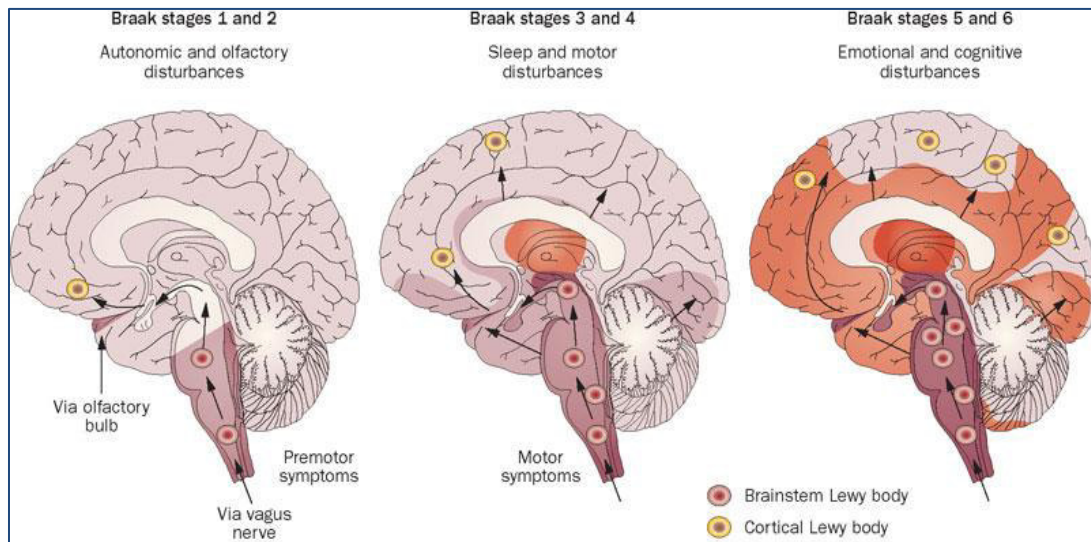


Figure 3. La classification neuropathologique de la MP de Braak, suggérant que la pathologie de Lewy s'initie dans le bulbe olfactif et la partie basse du tronc cérébral (noyau dorsal du nerf vague), avant de gagner le mésencéphale et les aires corticales.

1.4.2 Au-delà du tronc cérébral : une maladie du système nerveux autonome

La distribution des corps de Lewy en dehors de l'encéphale, bien que déjà rapportée à la fin des années 1980 (Kupsky et al., 1987; Wakabayashi et al., 1988) n'a pas suscité grand intérêt, jusqu'à ce que l'hypothèse d'une progression caudo-rostrale de la pathologie de Lewy soit émise par l'équipe de Braak en 2003. Depuis, plusieurs équipes ont taché d'évaluer de façon plus exhaustive la distribution de la STL. Ils ont pu mettre en évidence que la STL est également présente en dehors de l'encéphale.

Elle est fréquemment observée dans certains noyaux de la moelle épinière et dans le système nerveux autonome :

- Le système nerveux sympathique : noyau intermédiolatéral de la moelle thoracique et les ganglions sympathiques coeliaques, cardiaque et les fibres noradrénergiques cardiaques (Bloch et al., 2006; Braak et al., 2007a; Orimo et al., 2008; Wakabayashi and Takahashi, 1997)
- Le système nerveux parasympathiques (Bloch et al., 2006; Braak et al., 2007a; Wakabayashi and Takahashi, 1997)

- Le système nerveux entérique (Beach et al., 2010; Braak et al., 2006b; Lebouvier et al., 2010a; Wakabayashi et al., 1988),

Elle a aussi été retrouvée dans les fibres nerveuses cutanées (Ikemura et al., 2008), dans les glandes surrénales (Fumimura et al., 2007), les glandes sous-maxillaires (Adler et al., 2014a), le tractus génito-urinaire (Beach et al., 2010).

1.4.3 Cas particuliers des sujets avec corps de Lewy incidents

La découverte fortuite de corps de Lewy à l'examen neuropathologique *post mortem* cérébral chez des sujets cliniquement indemnes de MP définit les sujets à corps de Lewy incidents. En pratique ces cas correspondent aux sujets pour lesquels la pathologie de Lewy est limitée aux noyaux du tronc cérébral et / ou à la substance noire sans perte neuronale trop importante, pour que les sujets ne développent pas de syndrome parkinsonien, et/ou de façon éparse dans des régions cérébrales corticales. La présence de corps de Lewy incidents augmente avec l'âge, de 10 à 31 % selon les études (Alafuzoff et al., 2008; Elobeid et al., 2016; Jellinger, 2004; Knopman et al., 2003; Parkkinen et al., 2003). Déterminer si ces cas sont des sujets pré-parkinsoniens a fait débat ces dernières années puisqu'on ne peut pas être certain que ces sujets auraient développé une MP s'ils avaient vécu assez longtemps.

Néanmoins, l'étude de séries de patients a mis en évidence un continuum dans le degré d'atteinte du tronc cérébral et, des structures limbiques, suggérant que ces sujets sont des sujets précliniques ou plutôt à un stade pré-moteur de la maladie (DelleDonne et al., 2008). De plus ces sujets ont une perte neuronale dopaminergique évaluée par l'expression de la tyrosine hydroxylase dans la substance noire comparativement aux sujets contrôles, suggérant que la présence de corps de Lewy incidents n'est pas bénigne et est associée à une atteinte infraclinique de MP ou DCL (Beach et al., 2008a; Dickson et al., 2008; Iacono et al., 2015).

1.4.4 Des corrélations clinico-neuropathologiques

Etant donnée l'étendue de la pathologie de Lewy le long du système nerveux central et autonome il semble vraisemblable que l'atteinte neuropathologique diffuse sous-tende les nombreux symptômes moteurs et non moteurs de la maladie. Les potentielles corrélations anatomo-cliniques sont rapportées dans le tableau 1.

Cependant la densité des corps de Lewy n'est pas toujours corrélée à la sévérité de la perte neuronale, ni à la sévérité des symptômes comme dans la substance noire par exemple (Greffard et al., 2010). En outre la présence des agrégats d' α -synucléine n'est pas non plus corrélée à l'atteinte fonctionnelle en ce qui concerne les fonctions cognitives et intellectuelles. Des études cliniques et pathologiques rétrospectives ont montré qu'il n'y a pas de relation entre le stade de pathologie de Lewy et de la gravité de la déficience cognitive à un stade avancé de PD (Jellinger, 2009, 2011, Parkkinen et al., 2005, 2008; Weisman et al., 2007). Ceci vient du fait que les troubles cognitifs sont plus sévères en présence d'une copathologie de type Alzheimer.

La classification de Braak ne repose pas sur la perte neuronale mais sur la topographie de la pathologie de Lewy ce qui rend les corrélations anatomo-cliniques parfois délicates.

Si des corrélations existent entre la survenue des symptômes non moteurs et la pathologie de Lewy dans le système nerveux périphérique, alors l'atteinte du système nerveux périphérique pourrait survenir précocement au cours de l'évolution de la maladie (Bloch et al., 2006). Ceci a conduit à proposer que le processus pathologique puisse débuter en périphérie dans le système nerveux entérique et gagner le système nerveux central par l'innervation sympathique et ou vagale (Braak et al., 2006a; Del Tredici and Braak, 2016).

Nous reviendrons plus en détail sur l'atteinte du SNE au cours de la MP dans un paragraphe dédié.

Région anatomique	Corrélations cliniques putatives
Bulbe olfactif, cortex olfactif primaire	Hyposmie, anosmie
Noyau dorsal du vague, système nerveux entérique	Constipation, gastroparésie
Neurones sympathiques pré et post ganglionnaires	Troubles génito-urinaires, hypotension orthostatique
Corne dorsale de la moelle épinière	Douleurs
Complexe cœruleus/subcœruleus, noyaux réticulaires	Troubles du sommeil paradoxal, dépression
Substance noire	Akinésie, bradykinésie, rigidité
Noyau basal de Meynert	Troubles cognitifs
Mésocortex temporal	Syndrome dysexécutif, apathie, troubles mnésiques
Isocortex associatif multimodal (préfrontal notamment)	Agnosie, apraxie

Tableau 1 : Corrélations potentielles entre les régions touchées par la pathologie de Lewy et les signes non-moteurs de la maladie de Parkinson

1.4.5 Controverses sur l'hypothèse de Braak et perspectives

Bien que l'hypothèse d'une progression caudo-rostrale de la pathologie de Lewy ait été confirmée par de nombreuses études autopsiques, celle-ci reste débattue (Beach et al., 2009; Jellinger, 2009). D'une part la méthodologie de l'étude autopsique publiée en 2003 est sujette à discussion. Ils ont en effet défini les sujets en patients parkinsoniens et ceux à corps de Lewy incidents selon les données neuropathologiques *a priori*, à savoir l'atteinte obligatoire de la substance noire pour le groupe parkinsonien et l'atteinte des sites suspectée initiaux (noyau dorsal du nerf vague) pour les cas incidents. Ceci sous-tend que tous leurs sujets à corps de Lewy incidents avaient une atteinte du noyau dorsal du nerf vague, considéré par les auteurs comme le site obligatoire initial de la pathologie de Lewy. Des études ont montré que 6 à 43 % des patients ne respectent pas cette ascension des lésions. Entre autres, certains patients sont indemnes de pathologie de Lewy dans le noyau dorsal du vague (Kalaitzakis et al., 2008). Ceci a conduit Braak et ses collaborateurs à proposer qu'il pouvait y avoir plusieurs portes d'entrée possibles du processus pathologique, à savoir le système nerveux entérique ou les voies

olfactives (Hawkes et al., 2007). A l'heure actuelle, il reste possible que le processus pathologique s'initie dans le système nerveux parasympathique, dans les bulbes olfactifs, dans le système nerveux entérique ou dans le système nerveux sympathique (Del Tredici and Braak, 2012, 2016).

De plus la cotation de Braak ne semble pas corrélée à l'évolutivité de la maladie, que ce soit la sévérité clinique, la durée d'évolution de la maladie ou la sévérité de perte neuronale nigrale (Jellinger, 2009).

En conclusion la MP n'est plus considérée comme une maladie limitée à la substance noire, mais comme une maladie qui touche l'ensemble du cerveau et du système nerveux, en particulier le système nerveux autonome. La MP comprend en outre un spectre de symptômes neurologiques non moteurs variés, comprenant des troubles de l'olfaction, des troubles du comportement en sommeil paradoxal, des symptômes de dysautonomie (troubles gastro-intestinaux, vésico-sphinctériens et cardio-vasculaires), la douleur, les troubles de l'humeur. Des corrélations entre les symptômes neurologiques et la topographie de la pathologie de Lewy sont probables, mais on ne sait pas si la sévérité de la pathologie de Lewy est corrélée à l'intensité des symptômes cliniques.

L'hypothèse de la progression caudo-rostrale proposée par l'équipe de Braak est séduisante à plusieurs points de vue. Premièrement la topographie de la pathologie semble sous-tendre certains symptômes et le schéma de progression permettrait de rendre compte de la chronologie d'installation des symptômes dont certains sont précoces, pré-moteurs et d'autres surviennent avec l'évolution de la maladie. Deuxièmement elle permet d'intégrer des données de la physiopathologie de la MP à savoir le rôle délétère de l'environnement et des pesticides. Ainsi un agent issu de l'environnement pourrait enclencher un processus pathologique au niveau de l'épithélium digestif ou olfactif, qui s'étendrait par la suite de proche en proche par le nerf vague ou par le nerf olfactif respectivement jusqu'au tronc cérébral, mésencéphale ou plus directement aux régions cérébrales limbiques et corticales. Cette propagation de proche en proche a fait émerger le concept de propagation de type *prion-like* qui pourrait être assurée par l' α -synucléine pathologique.

2. La MP une synucléinopathie

2.1 La découverte de l' α -synucléine

La famille des synucléines comprend l' α , la beta et la gamma-synucléine. L' α -synucléine est une protéine soluble fortement conservée chez les vertébrés et abondamment exprimée dans le cerveau, et concentrée au niveau des terminaisons présynaptiques. Elle a été découverte initialement en 1988 à partir de vésicules synaptiques purifiées chez le poisson torpille (Maroteaux et al., 1988), et dénommée synucléine à partir de sa localisation subcellulaire, « syn » pour synapse et « nuclein » pour le noyau. Cette protéine est localisée au sein des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer et est précurseur du composé amyloïde non-A β (NAC) sans que son lien avec la maladie d'Alzheimer soit identifié. En 1994 Ross Jakes à Cambridge purifie à partir de cerveaux humains et séquence deux protéines de 140 et 136 acides aminés. Celle de 140 acides aminés est fortement similaire à la protéine synucléine de la raie torpille décrite par Luc Maroteaux et la deuxième a 61 % d'homologie de séquence peptidique avec celle de 140 acides aminés, ce qui conduit l'équipe de Jakes à les nommer respectivement α - et bêta- synucléines (Jakes et al., 1994).

2.2 L' α -synucléine : élément central dans la physiopathologie de la MP

Alors qu'il s'agit essentiellement d'une maladie sporadique, la découverte de la mutation A53T dans le gène codant l' α -synucléine dans des cas familiaux de MP en 1997 a contribué à concentrer une grande partie de la recherche sur la MP sur cette protéine (Polymeropoulos et al., 1997). D'autres mutations dans le gène codant l' α -synucléine ont été identifiées par la suite. Actuellement six mutations faux sens (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E) (Krüger et al., 1998; Lesage et al., 2013; Pasanen et al., 2014; Proukakis et al., 2013; Zarranz et al., 2004) et les duplications/triplications du gène *SNCA* sont associées à des formes génétiques de MP et de nombreux variants sont associés à un risque augmenté de MP (Corti et al., 2011).

Peu de temps après la découverte de mutation dans le gène *SNCA*, l'équipe de Spillantini a pu mettre en évidence que les corps de Lewy étaient composés d'agrégats intra-neuronaux d' α -

synucléine, et ceci dans les formes sporadiques idiopathiques de MP (Spillantini et al., 1997), renforçant encore le lien entre l' α -synucléine et la physiopathologie de la MP. La détection d'inclusions pathologiques d' α -synucléine a conduit à regrouper sous le terme de synucléinopathies l'ensemble des maladies caractérisées sur le plan neuropathologique par la présence de dépôt de synucléine agrégée, comme la MP, la démence à corps de Lewy, l'atrophie multi-systématisée ou l'hypotension orthostatique idiopathique. Depuis de nombreux travaux sont menés pour comprendre l'implication de la protéine dans la physiopathologie de la MP.

2.3 Localisation

La protéine est abondamment exprimée dans le cerveau, correspond à 0,5 à 1 % des protéines du cerveau humain. L'IHC anti-synucléine montre un marquage diffus du neuropile correspondant aux terminaisons synaptiques, habituellement sans corps de Lewy dans le cerveau sain. Elle est également exprimée en conditions physiologiques dans le système nerveux périphérique (Böttner et al., 2012; Phillips et al., 2008), dans les cellules hématopoïétiques (les érythrocytes (Nakai et al., 2007), les cellules sanguines circulantes mononuclées (Kim et al., 2004) et les plaquettes (Li et al., 2002)), les cellules endothéliales et musculaires lisses (Tamo et al., 2002) et dans les fibres musculaires (Askanas et al., 2000).

Au cours de la MP, l' α -synucléine est également retrouvée dans des astrocytes et oligodendrocytes (Braak et al., 2007b).

2.4 Des fonctions physiologiques multiples

La fonction physiologique de la protéine n'est à ce jour pas complètement élucidée. Elle joue un rôle important dans la plasticité synaptique, la dynamique des vésicules, le transport axonal, la synthèse et la sécrétion de neurotransmetteurs (revues dans Bendor et al., 2013; Kim, 2013; Vekrellis et al., 2011).

Elle ne semble pas être impliquée dans le développement des synapses mais plutôt dans la modulation de la plasticité synaptique. Alors que les souris génétiquement déléetées de l' α -synucléine ont une architecture cérébrale et des contacts synaptiques normaux, sans anomalie comportementale évidente les souris triples knockout (α -, β - et γ -synucléine) ont une espérance de vie limitée et une dysfonction de la plasticité synaptique à long terme. Elles ont des difficultés motrices associées à une altération de la transmission dopaminergique (Anwar et al., 2011). L' α -synucléine interagit physiquement avec au moins 30 protéines, sous tendant son rôle important dans la signalisation cellulaire (Breydo et al., 2012).

2.5 Structure de l' α -synucléine

2.5.1 Séquence primaire

L' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés, produit du gène *SNCA* localisé sur le chromosome 4 (4q21-q23) chez l'homme. Sa séquence peptidique est hautement conservée entre les espèces et est composé de 3 domaines fonctionnels (Figure 4) :

- La région N-terminale (acides aminés 1 à 60), hautement conservée, comprenant des répétitions en tandems imparfaites de séquences uniques et hautement préservées KTKEGV (= lysine, thréonine, lysine, acide glutamique, glycine, valine). Ces répétitions s'étendent des résidus 10 à 86 et permettent de conférer à cette partie N-terminale de l' α -synucléine une structure **en hélices α amphipathiques** (George et al., 1995). Cette région a un rôle dans la liaison aux membranes. Selon le type d'interaction aux membranes l' α -synucléine peut adopter une structure composée de deux hélices α antiparallèle avec une courte région de liaison ou bien une hélice α unique plus longue comprenant les résidus précédents. De façon intéressante les six mutations connues associées à la maladie de Parkinson familiale sont situées dans cette région. Seules trois de ces mutations (E46K, H50Q, A53T) sont associées à une augmentation de la propension de l' α -synucléine à former des agrégats insolubles.

- La région centrale hydrophobe (non-amyloid- β component or NAC domain) (résidus 61–95), avec trois répétitions KTKEGV, impliquée dans l’auto-assemblage de la protéine en fibrilles amyloïdes et en conformation en **feuilletés beta** ;
- La région C-terminale (96-140) riche en acides aminés chargés négativement, intervenant comme une **protéine chaperon** par son interaction avec la partie N-terminale, régulant ainsi la conformation et la solubilisation de la protéine (Dedmon et al., 2005)

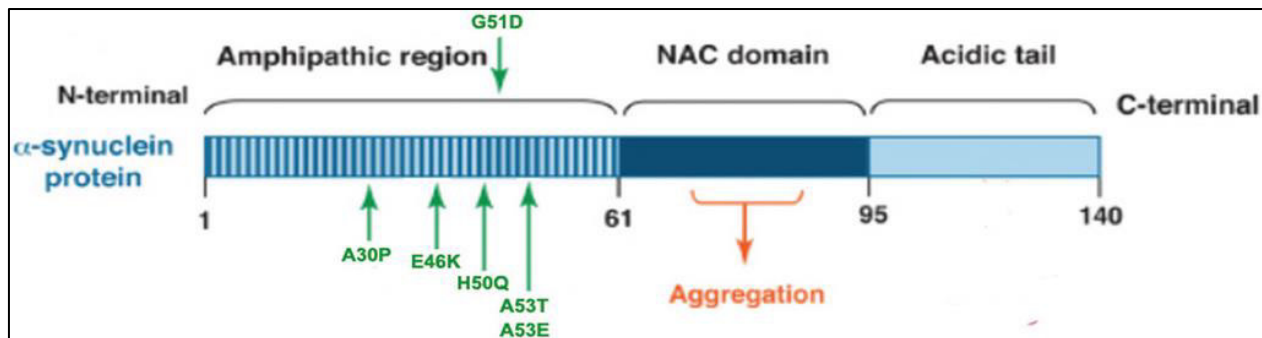


Figure 4. Domaines fonctionnels de l'α-synucléine. Le domaine NAC est le domaine enclen à l'agrégation. Noter que les six mutations décrites responsables de MP sont situées dans le domaine N-terminale de la protéine.

2.5.2 Modifications post-traductionnelles de l'α-synucléine

Il a été décrit environ 300 types de modifications post traductionnelles de l'α-synucléine. Elles incluent l'acétylation de son extrémité N- et C-terminale, la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine, l'ubiquitination de résidus lysine et la nitration de tyrosine (Lashuel et al., 2013; Oueslati et al., 2010).

La **phosphorylation** est la plus étudiée puisqu'elle est associée à la pathologie. L'α-synucléine extraite de corps de Lewy humain est principalement sous forme phosphorylée sur son résidu sérine 129 et cette phosphorylation favorise la fibrillation de la protéine (Fujiwara et al., 2002). Il est estimé que 90 % de l'α-synucléine agrégée est phosphorylée sur la sérine 129. A noter tout de même que cette phosphorylation est aussi décrite en faible quantité (estimée à environ 4 %

de l' α -synucléine) dans le cerveau considéré « sain » (Anderson et al., 2006; Fujiwara et al., 2002).

Plusieurs études basées sur des techniques de spectroscopie (DC et RMN) ont été menées pour comprendre l'effet de la phosphorylation de la sérine 129 sur la structure de la protéine et sur sa propension à s'assembler. Les données obtenues par DC montre que la phosphorylation sur Ser129 ne modifie pas la structure secondaire, sa structure pelote statistique non périodique (*random coil*), par opposition aux hélices et aux feuillets qui sont des structures périodiques (Paleologou et al., 2008). Les études *in vitro* ou *in vivo* cherchant à établir si la phosphorylation sur la Ser129 favorise ou protège de son agrégation et à évaluer sa cytotoxicité ont abouti à des résultats divergents, selon le modèle utilisé ou la manière dont la phosphorylation a été induite. La phosphorylation sur la Ser129 a un rôle physiologique et joue vraisemblablement un rôle sur la régulation de la conformation de la protéine, sa liaison membranaire et sa distribution subcellulaire (Oueslati, 2016).

En revanche, la phosphorylation sur son résidu Sérine 87 semble inhiber l'oligomérisation et l'agrégation de l' α -synucléine (Oueslati et al., 2012).

2.5.3 Conformation / Structure native

La recherche de la structure native de l' α synucléine et des facteurs influençant sa conformation est cruciale pour comprendre la pathogenèse de la MP. Elle a conduit à de nombreux travaux ces vingt dernières années et fait encore débat.

Il a été montré initialement que l' α -synucléine purifiée était un **monomère composé d'hélices α** , qui migrait sur des gels d'acrylamide selon un poids moléculaire (PM) apparent autour de 20 kDa. Les analyses sur gels en conditions natives indiquaient, elles, un poids moléculaire apparent de 57-58 kDa. Ces constatations ont conduit à proposer que les monomères d' α -synucléine sans structure secondaire identifiée pouvaient adopter en solution une conformation complexe formant une sorte de protéine globulaire expliquant son PM apparent élevé. Cette hypothèse était confortée par des analyses structurales en dichroïsme circulaire, spectroscopie

infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS de l'anglais : *Small Angle X-rays Scattering*) qui ne retrouvaient pas de structure secondaire identifiée. L' α -synucléine appartenait à cette famille récemment décrite que sont les protéines avec **structure intrinsèque désordonnée** (Weinreb et al., 1996; Wright and Dyson, 1999). Cette caractéristique fréquente, puisqu'elle concerne environ 40 % des protéines des cellules eucaryotes confère aux protéines une flexibilité de structure et la possibilité de s'adapter aux conditions environnantes et d'assurer des rôles physiologiques multiples (Uversky, 2015). En présence de micelles lipidiques, l' α -synucléine peut s'y lier et adopter dans ce cas une structure en hélice α (Ulmer et al., 2005).

En 2011 Bartels dans l'équipe de Selkoe publie dans Nature que l' α -synucléine native en conditions physiologiques était en fait sous forme d'un **complexe tétramérique hélicoïdal**. Ce travail portait sur l' α -synucléine physiologiquement exprimée dans les globules rouges, extraite en conditions non dénaturantes. Les auteurs ont réalisé une ultracentrifugation analytique qui indiquait un PM apparent de 57 KDa, une analyse de la géométrie des particules qui retrouvait qu'une molécule faisait environ 3 à 3,5 nm. Ils ont également analysé 1000 particules d' α -synucléine et mis en évidence des particules de 10 à 175 KDa de PM apparents avec un pic de distribution autour de 55kDa, pouvant correspondre à un tétramère (Bartels et al., 2011). Ce tétramère était composé de monomères d'hélices α et résistait à l'agrégation à l'état physiologique.

De plus, les travaux de Wang suggèrent que l' α -synucléine purifiée peut se trouver sous forme tétramérique hélicoïdal et que les mutations ponctuelles de l' α -synucléine (A30P, E46K et A53T) lui confèrent une structure moins ordonnée et plus sujette à l'agrégation (Wang et al., 2011).

Cette notion d'oligomère avait déjà été abordée en 2002 par Cole et ses collaborateurs. Ils ont mis en évidence de probables oligomères (dimère, trimère et oligomères correspondant à des bandes de migration électrophorétique de plus haut PM en traitant des cellules HEK 293 surexprimant l' α -synucléine par un agent chimique cross-linker (Cole et al., 2002).

Ces constatations ont été récemment confortées par les travaux de l'équipe de Selkoe. Cette équipe a également utilisée le cross-linking de l' α -synucléine *in vivo* et pour la première fois à

partir de culture primaire de neurones et de cerveaux humain. Les auteurs ont mis en évidence des formes tétramériques d' α -synucléine (Dettmer et al., 2013, 2015; Luth et al., 2015)(Figure 5).

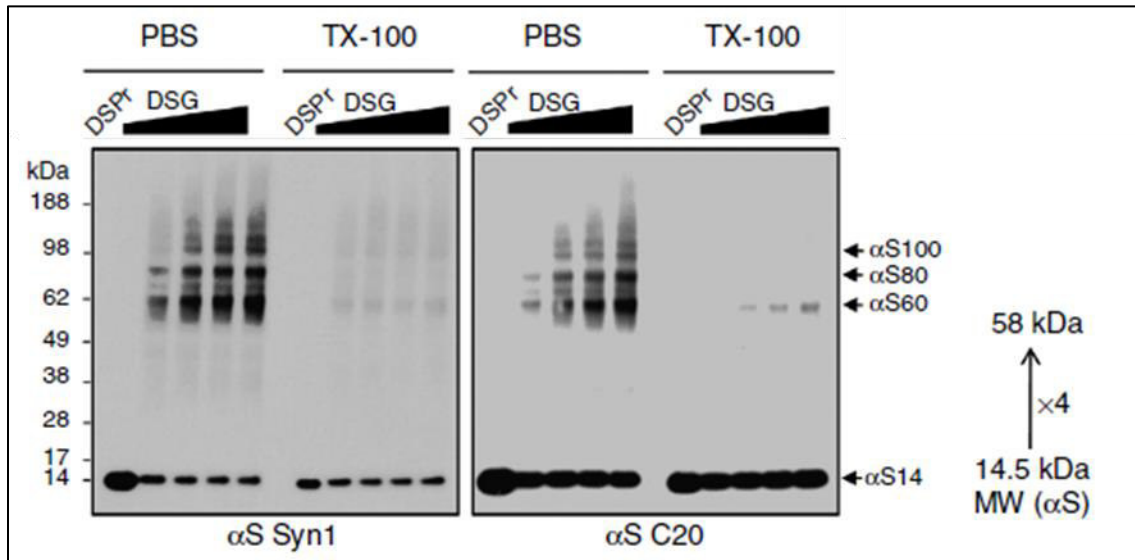


Figure 5. Multimères d' α -synucléine

Multimères d' α -synucléine de 60, 80 et 100kDa, obtenus après cross-linking utilisant le DSG dans les « cellules intactes » issues de cortex humain, (lysats cytosolique BPS ou membranaire TX-100). Ils sont visualisés par migration par western blot utilisant l'anticorps anti- α synucléine Syn1 à gauche et C-20 à droite. (Dettmer et al., 2015)

Enfin Gould a également mis en évidence des « conformères » d' α -synucléine dans le cerveau humain en employant dans un premier temps une filtration sur gel couplée à une migration sur gel en conditions natives puis une analyse par spectroscopie de masse (Gould et al., 2014).

Ces observations ont été controversées par de nombreuses équipes et sont encore débattues.

L'article de Fauvet et collaborateurs en 2012 réaffirme par opposition à la publication de Bartels en 2011 que l' α -synucléine native est bien sous la forme d'un monomère non structuré comme l'avait décrit Weinreb, et ceci en utilisant des méthodes biochimiques complémentaires (électrophorèse en conditions non dénaturantes, chromatographie par exclusion de taille et ELISA spécifiques d'oligomères), dans des tissus ou cellules variés (cellules neuronales et non

neuronales de mammifères, extraits de cerveaux humain ou murin), réalisées par 7 équipes de recherche indépendantes (Fauvet et al., 2012).

Burré retrouve la migration apparente autour de 62 kDa, pouvant a priori faire suspecter l'existence d'un tétramère mais conclue après analyse par dichroïsme circulaire et spectrométrie de masse qu'il s'agit là encore de monomère non structuré et dynamique qui doit augmenter le radius hydrodynamique et donc le PM apparent lors de la filtration sur gel (Burré et al., 2013). On peut trouver ici une explication plausible rendant compte des discordes dans l'interprétation des résultats. Plus récemment encore par une approche de résonance magnétique nucléaire (RMN) « in cell », Theillet et ses collaborateurs réaffirme que l' α -synucléine physiologique est essentiellement présente dans le cytoplasme, non liée aux membranes, et qu'elle semble être, au moins de façon majoritaire, sous forme de monomères, sans signe d'oligomérisation ou d'agrégation (Theillet et al., 2016).

En conclusion, l' α -synucléine est une protéine « caméléon », sa structure flexible lui assure vraisemblablement des fonctions physiologiques multiples et lui confère également une propension naturelle à l'agrégation. Alors qu'elle est pensée depuis des années être de façon majoritaire sous formes de monomères solubles avec flexibilité conformationnelle ou en hélices α liée aux membranes, l'existence de conformères instables en conditions physiologiques est actuellement une question débattue (Alderson and Bax, 2016).

2.6 Formes pathologiques de l' α synucléine

2.6.1 Les corps de Lewy

Les filaments d' α -synucléine (10-15 nm de large) sont les composants majeurs des inclusions pathologiques caractéristiques des synucléinopathies. Ces inclusions se situent dans les corps cellulaires des neurones dans le cas de la MP et de la démence à corps de Lewy diffus, ou dans les oligodendrocytes dans le cas de l'atrophie multisystématisée (Breydo et al., 2012). Comme mentionné précédemment, les corps de Lewy sont principalement constitués d' α -synucléine agrégée, d'ubiquitine et de neurofilaments (Spillantini et al., 1997).

L'étude par western blot de l' α -synucléine issue du cerveau d'un patient atteint de DCL, contenue soit dans la fraction particulaire insoluble soit dans la fraction soluble a permis de mettre en évidence que l' α -synucléine agrégée insoluble est à 90 % sous forme phosphorylée (Fujiwara et al., 2002). La même approche par électrophorèse bidimensionnelle (2D) a mis en évidence des formes agrégées de profils de migration différents dans la fraction particulaire insoluble du cerveau contenant des corps de Lewy que dans la fraction soluble du cerveau sain, suggérant que l' α -synucléine était le siège de multiples modifications post-traductionnelles (illustration Figure 6). L'analyse par spectroscopie de masse a retrouvé que la principale modification post-traductionnelle de l' α -synucléine des corps de Lewy était la phosphorylation en sérine 129, mais a identifié également des ubiquitinations des résidus lysines en positions 12, 21, et 23 et des troncations au niveau des résidus aspartate en 115 et 119, asparagine en 122, tyrosine en positions 133 et 135 (Anderson et al., 2006). Cette étude a retrouvé également qu'une faible proportion de l' α -synucléine est phosphorylée sur la sérine 129 de façon physiologique dans la fraction soluble. L' α -synucléine contenue dans les corps de Lewy est aussi nitratée (Giasson et al., 2000).

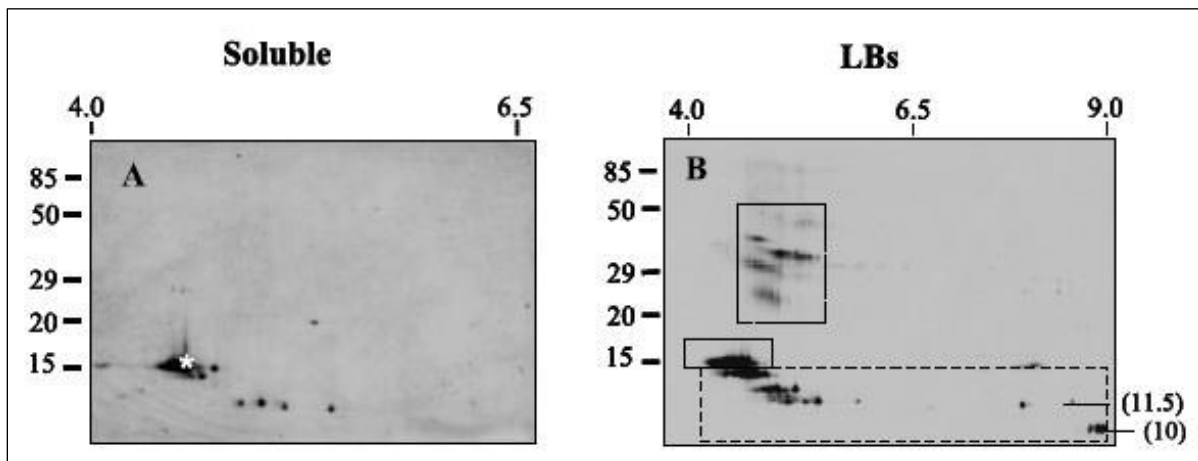


Figure 6. α -synucléine cérébrale dans les fractions soluble d'un patient contrôlé et particulaire d'un patient atteint de DCL (LB = Lewy body = corps de Lewy) (Anderson et al., 2006)

Immunoblots de l' α -synucléine cérébrale dans les fractions soluble d'un patient contrôlé (à gauche) et particulaire d'une préparation de corps de Lewy (à droite) déterminée par électrophorèse 2D-PAGE utilisant un gradient d'isoélectrofocalisation pH 4–7 et l'anticorps anti-synucléine Syn-1. L'astérisque blanc indique l' α -synucléine complète, non modifiée en dehors de la N-acétylation. Le carré en trait plein montre les modifications acides de l' α -synucléine monomérique complète, le carré en tirets montre les espèces tronquées en C-terminale et le carré en pointillés les espèces de plus hauts PM.

L'effet protecteur ou nocif des corps de Lewy sur la survie neuronale est débattu. Dans la MP, la proportion constante de neurones de la *substantia nigra* comportant des corps de Lewy tout au long de l'évolution suggère que ceux-ci conduisent à la destruction neuronale, sur une période estimée d'environ 6 mois (Greffard et al., 2010).

2.6.2 Agrégation de l' α -synucléine : seeding

Comme décrit dans le paragraphe précédent, en conditions physiologiques, l' α -synucléine est majoritairement soluble, non structurée (« unfolded protein ») ou bien liée aux membranes ce qui favorise sa structure en hélice α . Certaines conditions (variation de pH, de température, interaction avec les phospholipides) influent sur la conformation de l' α -synucléine, notamment sur la formation de feuillets beta. Cette trans-conformation est l'étape préalable aux processus de dimérisation puis d'oligomérisation qui conduisent à la formation d'agrégats pathologiques et de fibrilles amyloïdes (Dehay et al., 2015; Uversky, 2001) (Figure 7).

Le processus de formation de l' α -synucléine agrégée *in vitro* suit un pattern identique que celui décrit pour la protéine prion pathologique et peut être divisé en 3 étapes (Narhi et al., 1999; Villar-Piqué et al., 2015; Wood et al., 1999) :

- Une phase de latence, étape limitante du processus, lors de laquelle certains monomères vont subir de façon stochastique une trans-conformation (ou « misfolding ») en adoptant une structure prédominante en feuillets beta plissés, vont s'agréger en une sorte de noyau protéique formé de précurseurs amyloïdes (phase dite de nucléation)
- Phase d'élongation rapide dans laquelle les fibrilles s'accroissent exponentiellement, en disposant les feuillets beta plissés côte à côte de façon anti-parallèle. L'élongation est rapide et proportionnelle à la concentration en α -synucléine
- Phase stationnaire lors de laquelle une déplétion en monomère entraîne une diminution du taux de croissance fibrillaire.

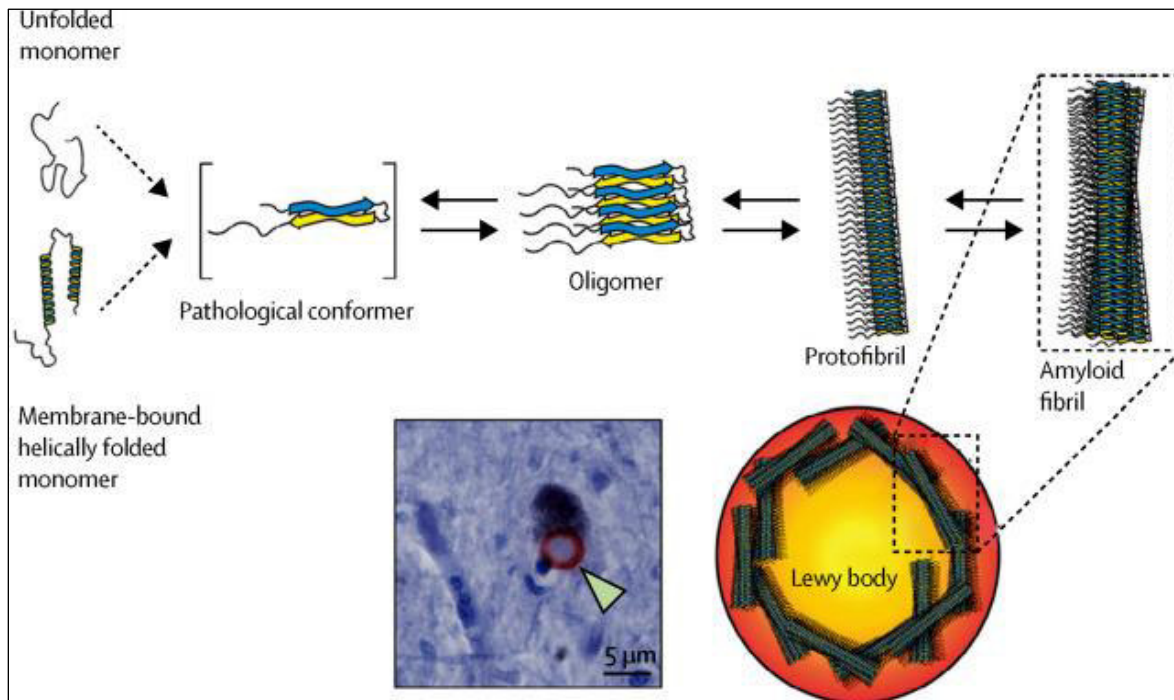


Figure 7. Représentation schématique des modifications moléculaires aboutissant à la formation d'inclusions pathologiques d' α -synucléine. D'après (Dehay et al., 2015).

L' α -synucléine physiologique existe dans au moins deux isoformes structurales: un monomère destructuré natif soluble et une forme liée à la membrane riche en hélice α . Les deux isoformes peuvent subir des modifications structurales importantes, acquérir de façon stochastique une structure en feuillets bêta plissés (trans-conformation). Le monomère peut alors se regrouper en petites espèces oligomériques qui peuvent être stabilisées par des interactions en feuillets β , puis en protofibrilles plus haut poids moléculaire insolubles, qui peut polymériser en fibrilles amyloïdes, et constituer des inclusions de type corps de Lewy.

La photographie montre un corps de Lewy (flèche verte) marqué par l' α -synucléine (en rouge) dans un neurone mésencéphalique contenant de la neuromélanine à partir d'un patient atteint de MP sporadique.

Une notion récente au sein de cette étape de nucléation ou « seeding » partagée également par la protéine Prion est celle de **template** ou spécificité de « souche » d' α -synucléine, soulignant la spécificité de certaines malconformations et que l'étape d'amplification ne se fait qu'avec la malconformation initiale (Figure 8)(Uchihara and Giasson, 2016).

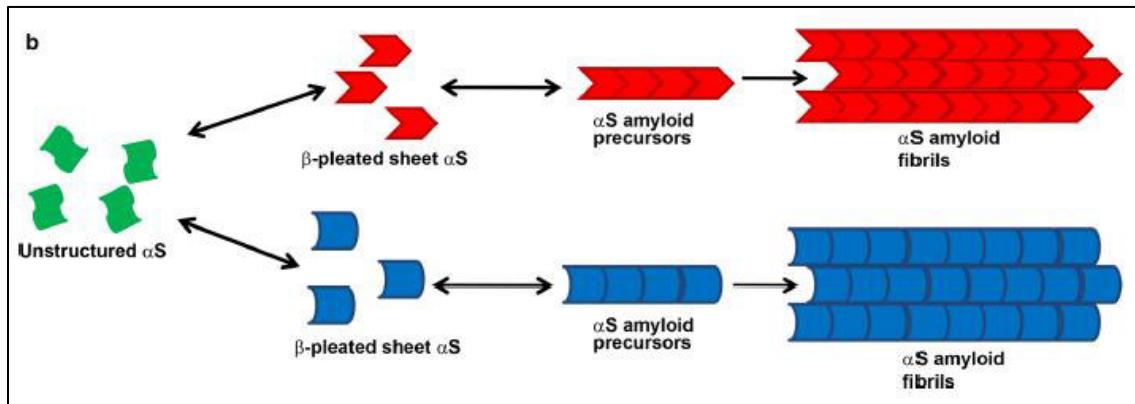


Figure 8. Représentation schématique des modifications moléculaires aboutissant à la formation d'inclusions pathologiques d' α -synucléine et du caractère spécifique de souches. D'après (Uchihara and Giasson, 2016)

L' α -synucléine physiologique sous forme de monomères solubles déstructurés (en vert), qui peuvent acquérir de façon stochastique une structure en feuillets bêta plissés (en rouge ou en bleu). Suite à cette trans-conformation l' α -synucléine peut s'oligomériser en précurseur amyloïdes qui peuvent alors croître en fibrilles amyloïdes et constituer des inclusions de type corps de Lewy.

Illustration du caractère spécifique de souches (« strain ») des polymères d' α -synucléine. Les conformères en feuillets bêta plissés peuvent exister sous différentes conformations (rouge ou bleu) qui ne sont pas compatibles pour s'oligomériser entre eux et forment donc des fibrilles distinctes.

Facteurs influençant l'agrégation :

Le domaine NAC de l' α -synucléine, hydrophobe, est le domaine le plus enclin à s'agréger. Il est partiellement protégé de l'agrégation par les charges positives et négatives des extrémités N- et C-terminales qui viennent interagir entre elles et avec la région NAC, recouvrir la région NAC et stabiliser la protéine (Bertoncini et al., 2005). Différents facteurs peuvent réguler ces interactions et influencer sur l'agrégation de la protéine :

- Les mutations ponctuelles :

Les mutations A53T et H50Q donnent une plus grande propension pour interagir avec les membranes, d'autres mutations A30P G51D et A53E l'atténuent. Certaines mutations sont associées à une plus grande rigidité au niveau des extrémités N- et C- terminales et pourraient modifier les interactions stabilisatrices avec les extrémités (Sahay et al., 2015).

- Les modifications post traductionnelles de l'α-synucléine : les troncations (C terminale), la phosphorylation, la nitration, l'oxydation
- La concentration d'α-synucléine
- Le pH
- La température

2.6.3 Des capacités de diffusion (« spreading »)

En plus de sa capacité à se trans-conformer et à s'amplifier sous formes de fibrilles amyloïdes, différentes expériences *in vitro* ou *in vivo* ont mis en évidence que l'α-synucléine pouvait aussi se propager d'une cellule à une autre. L'alpha-synucléine peut adopter des propriétés identiques à celle de la protéine prion pathologique et peut constituer le substrat moléculaire de la propagation de la maladie de Parkinson (pour revues Brandel et al., 2015; Brundin et al., 2016; Goedert et al., 2014; Prusiner, 2012).

De nombreuses études *in vitro* ont montré de façon convaincante que les neurones en culture peuvent à la fois sécréter l'α synucléine et la capter à partir de l'espace extracellulaire (Hansen et al., 2011; Lee, 2008). L'α-synucléine recombinante sous forme de fibrilles préformées ou non, mises dans le milieu de culture peut aussi être captée par des neurones, s'oligomériser avec la synucléine endogène et causer la formation d'agrégats intracellulaires (Luk et al., 2009; Nonaka et al., 2010; Volpicelli-Daley et al., 2011).

De même, les expériences sur les animaux ont montré que l'α-synucléine peut être transmise de neurones à neurones. La transplantation de neurones ou de cellules souches neurales dérivés de rongeurs chez des animaux surexprimant l'α-synucléine humaine s'accompagne d'une incorporation de l'α-synucléine humaine au sein des neurones greffés (Angot et al., 2012; Desplats et al., 2009; Hansen et al., 2011; Kordower et al., 2011).

Enfin des injections intracérébrale, intramusculaire ou intra-péritonéale d'α-synucléine oligomérique dérivée soit de la protéine recombinante soit d'échantillons de cerveau *post mortem* obtenus lors d'autopsies de patients atteints de synucléinopathies provoque une

accumulation de l' α -synucléine dans des cerveaux murins ou primates non humains (Luk et al., 2012; Masuda-Suzukake et al., 2013; Mougenot et al., 2012; Paumier et al., 2015; Peelaerts et al., 2015; Prusiner et al., 2015; Recasens et al., 2014; Sacino et al., 2014a, 2014b).

Cette diffusion de l' α -synucléine survient dans les semaines suivant l'injection dans des cerveaux murins sur-exprimant l' α -synucléine mais aussi dans des cerveaux murins sains, suggérant que la diffusion de l' α -synucléine est un phénomène actif assez rapide. Néanmoins toutes ces études sont basées sur des modèles expérimentaux de synucléinopathies, dont les effets varient selon le type d'injection (type de fibrilles d' α -synucléine, concentration utilisée) et les résultats sont à interpréter avec prudence. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'il existe plusieurs type de fibrilles de synucléine qui ont des structures et des propriétés de propagation et de toxicité cellulaire différents (Bousset et al., 2013, 2013; Guo et al., 2013). Cette variabilité de fibrilles pathologiques d' α -synucléine pourrait sous tendre la variabilité de la topographie de l'atteinte (cellulaire et anatomique) et du profil évolutif que l'on observe au sein des synucléinopathies (atrophie multisystématisée, la MP et ses sous types évolutifs, la démence à corps de Lewy).

2.6.4 Neurotoxicité de l' α -synucléine

Malgré des années de recherche le rôle pathogène de l' α -synucléine et des corps de Lewy au cours de la MP n'est pas clair.

L'identification et la caractérisation des formes toxiques de l' α -synucléine restent incomplètes. Les espèces toxiques pourraient être les fibrilles insolubles de type amyloïdes, notamment identifiées dans les corps de Lewy ou les espèces préfibrillaires intermédiaires, solubles, telles que les oligomères et les protofibrilles. Plusieurs groupes ont passé au crible les différents états de l' α -synucléine et évalué leur toxicité. Winner et ses collaborateurs ont développé des variants mutés de l' α -synucléine, formant soit des fibrilles soit des oligomères, qu'ils ont injectés l'un ou l'autre dans des rats à l'aide de lentivirus. Ils ont retrouvé une toxicité accrue sur la perte neuronale dans la substance noire pour les mutants pro-oligomérique (Winner et al., 2011). Les expériences *in vitro* et *in vivo* concordent pour dire que les formes oligomériques sont toxiques

(Dehay et al., 2015), alors que les corps de Lewy pourraient être protecteurs (Tanaka et al., 2004).

3 Atteinte du système nerveux entérique au cours de la MP

3.1 Symptômes digestifs dans la MP

La présence de symptômes digestifs chez les patients parkinsonien est bien connue depuis des années, puisque décrits dès la première description de la maladie en 1817.

Les troubles gastro-intestinaux sont parmi les symptômes non moteurs les plus fréquents de la maladie de Parkinson avec une prévalence estimée à 75 % des patients parkinsoniens. Ils peuvent toucher l'ensemble du tube digestif : sensation de bouche sèche ou hypersalivation, dysphagie, pesanteur gastrique, nausée, constipation, troubles de la défécation. La prévalence de la constipation varie en fonction de la population étudiée et de sa méthode d'évaluation. Elle touche 20 à 89 % des patients parkinsoniens selon les études (Barone et al., 2009; Cersosimo and Benarroch, 2012b; Cersosimo et al., 2013; Chaudhuri et al., 2006; Edwards et al., 1994; Martinez-Martin et al., 2011). Les symptômes gastro-intestinaux, notamment la constipation peuvent être aggravés par le traitement dopaminergique de la MP mais sont aussi plus fréquents avec la sévérité et la durée d'évolution de la maladie (Cersosimo et al., 2013).

Il est bien connu que les symptômes gastro-intestinaux peuvent survenir précocement, des années avant l'apparition de symptômes moteurs. Ceci est d'autant plus vrai pour la constipation, qui lorsqu'elle est présente, est rapportée présente antérieurement aux symptômes moteurs jusqu'à chez 87 % des patients parkinsoniens (Cersosimo et al., 2013). Une étude récente basée sur l'interrogatoire de 109 patients parkinsoniens nouvellement diagnostiqués et 107 sujets témoins révèle que la constipation était présente le plus souvent plus de 10 ans avant le diagnostic (Pont-Sunyer et al., 2015) , au même titre que les troubles du comportement en sommeil paradoxal ou la somnolence diurne excessive. La sévérité de la constipation est associée à une augmentation du risque de développer une MP (Abbott et al., 2001, 2007; Cersosimo et al., 2013; Gao et al., 2011; Ross et al., 2012; Savica et al., 2009). Dans l'étude de Gao publiée en 2011 qui a suivi de façon prospective environ 30000 hommes

américains, ceux ayant une fréquence d'émission de selles inférieure ou égale à 3 par semaine ont eu un risque relatif de développer une MP dans les 6 années de suivi de 5 par rapport aux hommes ayant une selle quotidienne (Gao et al., 2011).

Avant de discuter de la physiopathologie des troubles gastro-intestinaux dans la MP, il est nécessaire de décrire auparavant l'organisation anatomique et fonctionnelle du système nerveux entérique.

3.2 Bases anatomique et fonctionnelle de l'innervation gastro-intestinale

Le tractus gastro-intestinal diffère des autres organes périphériques car il contient un vaste système nerveux intrinsèque, le SNE. Les fonctions digestives, en particulier motricité et sécrétion sont contrôlées par le SNE et par son innervation extrinsèque, assurée par les afférences et efférences sympathiques et parasympathiques issues du SNC.

3.2.1 Morphologie

Le SNE est un réseau neuronal intégré organisé en deux plexus ganglionnaires, le plexus myentérique (PM) et le plexus sous-muqueux (PSM), composés de neurones et de cellules gliales entériques. Le PM est situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire. Le PSM est situé entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse (Figure 9). L'œsophage et l'estomac ne comportent pas de plexus sous-muqueux. De façon schématique, le plexus myentérique contrôle l'activité motrice du tube digestif alors que le plexus sous-muqueux contrôle la sécrétion de mucus et le débit sanguin (Schemann and Neunlist, 2004). Le SNE contrôle la mobilité intestinale et les fonctions sécrétrices par des réflexes locaux de la paroi intestinale, les distorsions de la muqueuse et le contenu chimique de la lumière intestinale.

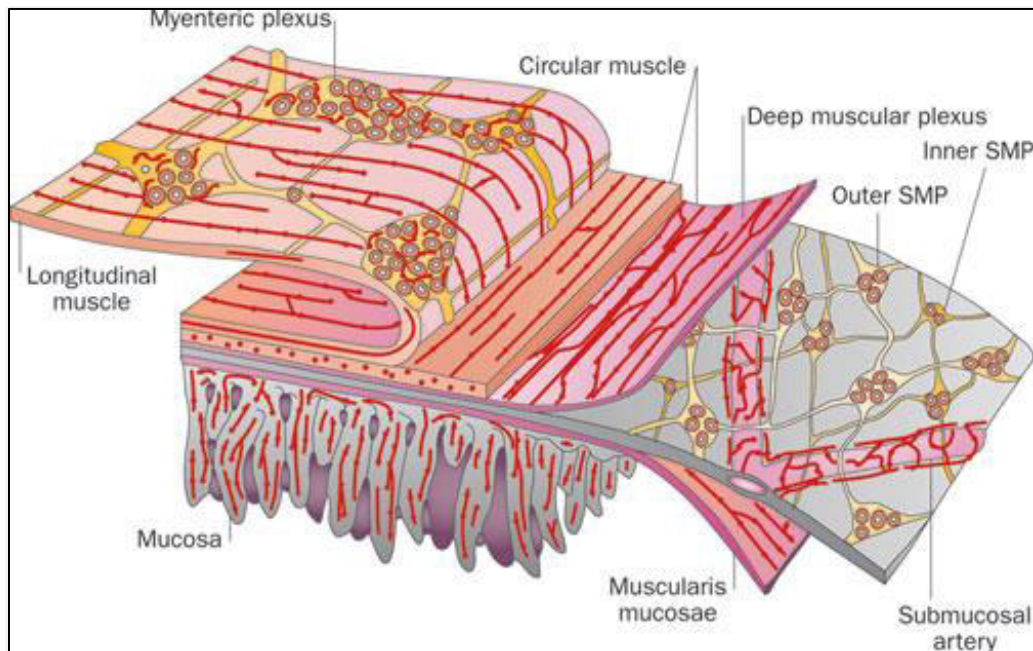


Figure 9. Organisation du SNE en plexus neuronaux (Furness, 2012)

Les fibres nerveuses contenues dans le tube digestif ont deux origines:

- **l'innervation intrinsèque**, la plus abondante, désigne les prolongements qui proviennent de neurones dont les corps cellulaires sont présents dans les différents plexus du SNE ; ces fibres projettent sur d'autres neurones (inter-neurones) ou sur les effecteurs de la paroi digestive (fibres musculaires lisses ou glandes).
- **l'innervation extrinsèque** (Figure 10), qui dépend du système nerveux autonome dont les cellules nerveuses sont situées en dehors du SNE, dans les ganglions autonomes. Les fibres nerveuses issues de ces plexus font synapse au niveau des plexus nerveux de l'innervation intrinsèque et modulent leur activité. Il s'agit des axones post-ganglionnaires sympathiques et pré-ganglionnaires parasympathiques qui projettent sur les neurones du SNE ou rarement directement sur les effecteurs. Il existe également une innervation viscérosensible extrinsèque.

La plupart des fibres sympathiques post-ganglionnaires proviennent des ganglions cœliaques ou mésentériques. Ces fibres efférentes inhibent le système nerveux entérique, ce qui entraîne une

diminution des sécrétions, des contractions et du tonus du tube digestif à l'exception des sphincters. Les axones nociceptifs du système digestif cheminent avec ceux du sympathique. Les fibres pré-ganglionnaires sympathiques sont issues des corps cellulaires présents dans les ganglions pré-vertébraux.

Le contrôle parasymphathique passe par le nerf vague pour la partie haute du tractus digestif jusqu'au colon transverse et les nerfs sacrés pour le côlon distal et le rectum. Lorsque le parasymphathique est stimulé, cela entraîne une augmentation de l'activité tant motrice que sécrétoire. Les neurones pré-ganglionnaires parasymphathiques sont issus du noyau dorsal du nerf vague.

Alors que la motilité de l'œsophage et de l'estomac est largement dépendent de l'innervation extrinsèque issue du noyau dorsal du nerf vague, le SNE contrôle la motilité intestinale et la sécrétion de façon largement indépendante de l'innervation extrinsèque (Cersosimo and Benarroch, 2008).

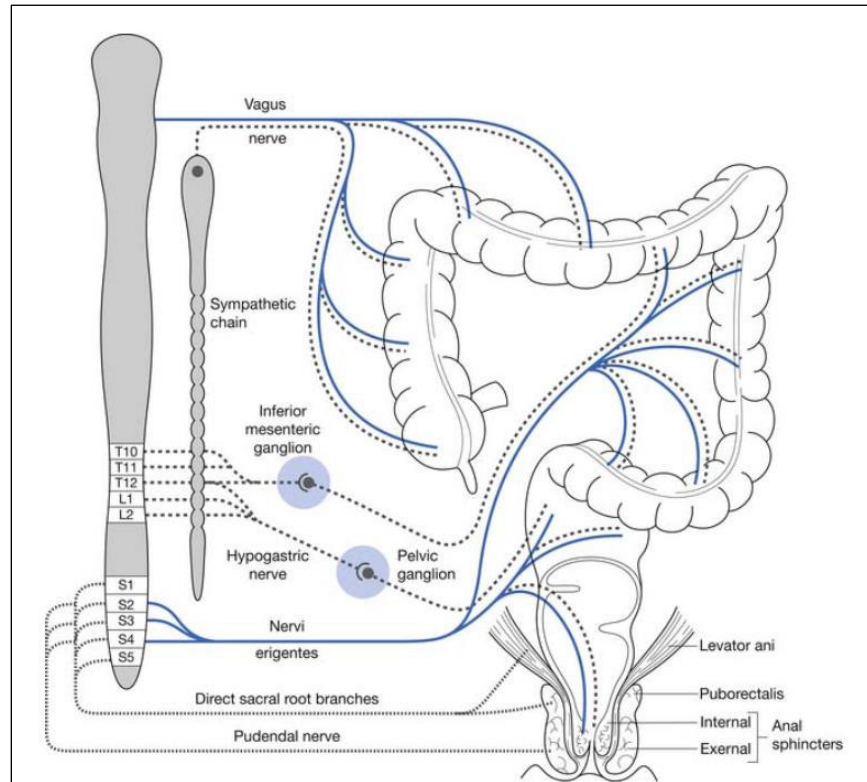


Figure 10. Innervation extrinsèque motrice colorectale.

L'innervation motrice parasympathique (lignes en bleu) passe par le nerf vague pour la partie haute du tractus digestif jusqu'au colon transverse et les nerfs sacrés pour le côlon distal et le rectum. L'innervation sympathique (lignes en pointillé) provient des ganglions cœliaques ou mésentériques, lieu de relais des neurones préganglionnaires dont les corps cellulaires sont localisés dans la colonne intermédiolatérale de la moelle de T9 à L2.

3.2.2 Neuromédiateurs du SNE

La signalisation neurochimique dans le SNE est extrêmement complexe. Une trentaine de neurotransmetteurs ou de messagers intercellulaires ont été identifiés dans le SNE et peuvent être classés en fonction de leur action excitatrice ou inhibitrice sur la motilité digestive (Benarroch, 2007; Furness, 2012). La plupart sont synthétisés et libérés par les neurones, même si leur implication directe dans la transmission synaptique reste parfois à démontrer (Hansen, 2003). Certains sont également sécrétés par d'autres types cellulaires (cellules entérochromaffines, cellules endocrines, mastocytes, etc.).

Ces neuromédiateurs entériques sont des petites molécules (noradrénaline [NA], acétylcholine [ACh], sérotonine [5-HT]), des bases puriques (adénosine, adénosine tri-phosphate [ATP]), des peptides (tachykinines [substance P et neurokinine A], vasointestinal peptide [VIP], calcitonin gene-related peptide [CGRP], somatostatine [som]) ou des gaz (protoxyde d'azote [NO]). Les neurones entériques expriment en général une combinaison de plusieurs de ces neuromédiateurs, définissant leur codage ou phénotype neurochimique. Un neuromédiateur principal peut être associé à un ou plusieurs co-neurotransmetteurs. Leur action varie en fonction du type de récepteur. La majorité des neurones utilisent l'acétylcholine (ACh), mais beaucoup utilisent aussi du monoxyde d'azote (NO), le peptide intestinal vasoactif (VIP), la substance P, le neuropeptide Y et l'adénosine-triphosphate (ATP) avec des combinaisons variées. Il existe également une plus petite proportion de neurones qui synthétisent de la dopamine, de la sérotonine ou du GABA. Schématiquement, le NO et VIP sont les principaux neurotransmetteurs inhibant la motricité intestinale et l'ACh et la substance P sont excitateurs de la motricité (Schemann and Neunlist, 2004).

Fonction	Codage neurochimique
Neurones sensoriels	ChAT, Calb, CGRP, and SP
Inter-neurones	ChAT, Calrétinine, ENK, SP, 5-HT, DYN, GRP, NOS, somatostatine, VIP
Neurones moteurs excitateurs	ChAT, SP, ENK, Calrétinine
Neurones moteurs inhibiteurs	NOS, VIP, DYN, ENK, GRP, NPY
Neurones sécréto-moteurs	ChAT, VIP, CCK, CGRP, DYN, NPY, somatostatine

Tableau 2 Les groupes fonctionnels de neurones du SNE et leur principaux neurotransmetteurs (Hansen, 2003; Schemann and Neunlist, 2004)

Calb calbindine, **CGRP** calcitonin gene-related peptide, **SP** substance P, **ENK** enképhaline, **5-HT** 5-hydroxytryptamine, **DYN** dynorphine, **GRP** gastrin releasing peptide, **CCK** cholecystokinine, **NPY** neuropeptide Y.

3.2.3 Les neurones entériques

Le nombre total de neurones entériques chez l'homme est estimé entre 400 et 600 millions, ce qui est supérieur au nombre total de tous les ganglions sympathiques et parasympathiques combinés, et approximativement égal au nombre de neurones de la moelle épinière (Furness, 2012). Les neurones entériques sont classés en différentes catégories selon leurs propriétés histochimiques, électro-physiologiques et fonctionnelles. Ils comprennent des neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN pour *intrinsic primary afferent neurons*), des interneurones, des neurones moteurs, des neurones sécréto-moteurs et des neurones vaso-moteurs. Ces neurones sont étroitement interconnectés entre eux au sein d'un ganglion et entre ganglions (Furness, 2006).

Les neurones cholinergiques forment la population dominante du tube digestif. Leur proportion tend à décroître selon un gradient oro-anal : dans le plexus myentérique, ils représentent de 57 à 72 % du nombre total de neurones au niveau de l'estomac, de 52 % à 66 % dans le grêle, et de 38 % à 65 % dans le côlon (Anlauf et al., 2003; Beck et al., 2009; Murphy et al., 2007). Les rares données disponibles sur le plexus sous-muqueux montrent des proportions similaires (Anlauf et al., 2003).

La deuxième population en fréquence est celle **des neurones nitrergiques**, en général distincts des cholinergiques. Leur proportion augmente selon un gradient oro-anal : ils représentent de 25 (Noorian et al., 2011) à 40 % (Pimont et al., 2003) des neurones myentériques dans l'estomac, 38% dans le grêle et la moitié dans le côlon (Anlauf et al., 2003; Beck et al., 2009; Noorian et al., 2011).

La troisième population est celle des **neurones VIP** mis en évidence directement par l'immunomarquage du neurotransmetteur. Approximativement 50 % des neurones myentériques expriment VIP dans l'estomac, contre 10 % dans le côlon (Neunlist et al., 2003; Pimont et al., 2003). En revanche, les neurones VIP sont nombreux dans le plexus sous-muqueux (de 50 à 79 % des neurones à tous les étages)(Anlauf et al., 2003). Si la littérature est convergente sur ce point, les études sont totalement divergentes sur le patron de coexpression des neurones VIP. A l'exception des neurones sous-muqueux coliques, ils seraient

principalement cholinergiques (Anlauf et al., 2003). A l'inverse, dans deux autres études (Noorian et al., 2011; Pimont et al., 2003), les neurones myentériques VIPergiques seraient pour moitié nitroergiques et pour moitié cholinergiques dans l'estomac, et nitroergiques au-delà. Ces derniers résultats semblent plus cohérents, le VIP comme le NO étant des neurotransmetteurs principalement inhibiteurs causant une relaxation musculaire. Ces divergences peuvent être liées à l'utilisation non conventionnelle du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) comme marqueur des neurones cholinergiques dans le travail d'Anlauf.

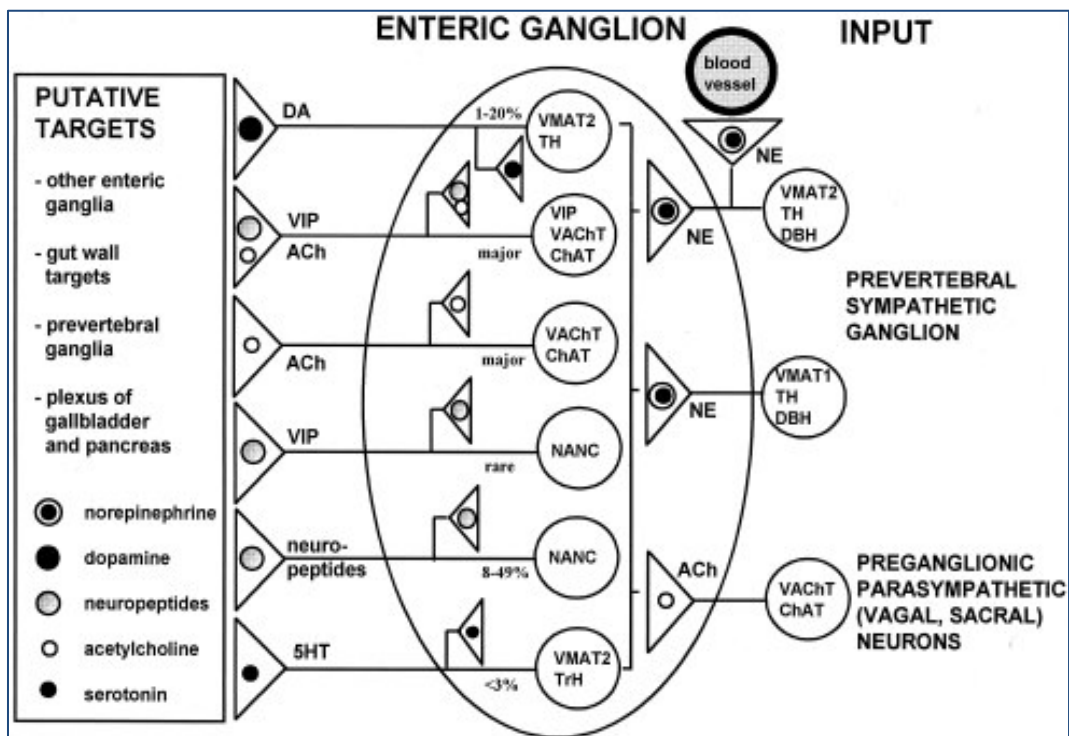


Figure 11. Phénotype neurochimique du SNE

Principales catégories de phénotypes neurochimiques dans l'innervation intrinsèque et extrinsèque de l'intestin humain et leurs cibles potentielles (Anlauf et al., 2003) :

Les neurones sympathiques pré-vertébraux sont caractérisés par la présence de la TH et de la dopamine bêta-hydroxylase (DBH) et sont extrinsèques noradrénergiques et expriment les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT1 ou VMAT2). L'innervation vagale cholinergique est caractérisée par la présence du transporteur vésiculaire de l'ACh et de l'enzyme ChAT.

Le SNE comprend de nombreux neurones intrinsèques. Les neurones catécholaminergiques sont caractérisés par l'expression de la TH, du VMAT2 mais pas de la DBH et sont supposés dopaminergiques. L'ACh et le VIP sont coprésents dans de nombreux neurones entériques. Quelques neurones sont purement cholinergiques ou purement VIPergiques (neurones non adrénérgiques non cholinergiques NANC). Les neurones NANC expriment VIP et/ou d'autres neuropeptides. Une proportion mineure des neurones sont sérotoninergiques, positifs pour VMAT2 et pour tryptophane hydroxylase (TrH).

Les neurones dopaminergiques expriment la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme synthétisant la dopamine, et le transporteur de la dopamine mais n'expriment pas la dopamine-béta-hydroxylase (DBH), ce qui les différencie des neurones extrinsèques noradrénargiques (Anlauf et al., 2003). Ces neurones dopaminergiques ont été identifiés en tant que neurones entériques intrinsèques en faible quantité chez la souris, le cochon d'Inde (Li et al., 2004) et chez l'homme (Anlauf et al., 2003) (Figure 11). De plus tous les sous-types de récepteurs dopaminergiques (D1 à D5) sont exprimés dans le SNE. Chez l'homme, une étude précise des proportions de neurones dopaminergiques a montré que ces neurones sont répartis selon un gradient oral-aboral. En effet les neurones dopaminergiques sont abondants dans le tractus digestif haut, représentant 14-20 % des neurones entériques totaux, alors que leur proportion diminue à 1-6% dans l'intestin grêle et le côlon (Anlauf et al., 2003). Plus précisément, une étude montre que dans le plexus myentérique la proportion de neurones positifs pour la TH est de $22 \pm 5\%$ dans l'estomac et de 1–7 % dans les autres régions du tractus digestif (duodénum, intestin grêle et côlon) (Annerino et al., 2012), alors que dans une étude antérieure (Singaram et al., 1995), la proportion de neurones coliques exprimant la TH atteignait 12 et 15 % dans le PM et PSM, respectivement. Cette différence importante s'explique vraisemblablement par la méthodologie différente (immunohistochimie sur coupes transversales incluses en paraffine, dans le premier cas, et immunofluorescence de surface sur préparations disséquées [*whole-mount*] dans le second). Ces neurones feraient partie de la population minoritaire non-cholinergique (Anlauf et al., 2003) et non-nitrergique (Noorian et al., 2011).

Une revue exhaustive souligne le rôle potentiel des neurones entériques dopaminergiques dans le contrôle de la mobilité intestinale (Natale et al., 2008). Bien que leur fonction ne soit pas précisément connue, ils sont supposés être inhibiteurs de la motricité intestinale. En effet les souris invalidées génétiquement pour le transporteur de la dopamine, qui ont donc un hyperfonctionnement dopaminergique, ont une diminution des contractions coliques induites électriquement, et le blocage chimique des récepteurs D1 et D2 augmente leurs contractions coliques (Walker et al., 2000). De plus les souris knock-out pour le récepteur D2 ont une mobilité intestinale augmentée (Li et al., 2006).

3.2.4 Autres populations cellulaires

L'appareil musculaire du tube digestif est constitué de larges faisceaux de **fibres musculaires** lisses (fml) formant des syncytiums électriques par l'intermédiaire de jonctions communicantes (*gap junctions*). Contrairement au SNC où l'unité motrice n'est reliée qu'à un motoneurone, ces unités fonctionnelles musculaires (« unités motrices ») sont contractées par des centaines de fibres nerveuses et subissent l'influence de multiples neuromédiateurs et facteurs neuro-hormonaux.

Les **cellules interstitielles de Cajal**, probablement liées aux fml par des jonctions communicantes (*gap junctions*), sont les cellules *pacemaker* du SNE. Leur action est de faire osciller le potentiel de membrane des fml. Les cellules interstitielles génèrent une contraction propagée coordonnée des fml sur de longues distances (ondes lentes). Cette activité propulsive purement myogène est inhibée ou modulée par le SNE, par action directe sur les fml ou par l'intermédiaire des cellules de Cajal qui reçoivent une abondante innervation (Costa, 2000).

Les **cellules gliales entériques** (CGE) possèdent de nombreuses propriétés morphologiques et fonctionnelles communes avec l'astroglie du système nerveux central. Quatre fois plus nombreuses que les neurones, les CGE forment un dense réseau cellulaire au sein du tissu nerveux entérique (dans les ganglions, les faisceaux interganglionnaires, le long des nerfs extrinsèques) et dans la *lamina propria*, en contact intime avec le pôle basal de l'épithélium digestif et avec les vaisseaux de la sous-muqueuse. Leurs fonctions trophiques et cytoprotectrices vis-à-vis des neurones dont elles régulent l'activité (par exemple en assurant la synthèse de précurseurs de neuromédiateurs) ne sont qu'un des aspects de leur activité. Les CGE sont nécessaires au maintien de la perméabilité de la barrière muqueuse épithéliale, et jouent un rôle de premier plan (en tant que présentateur d'antigène ou par la sécrétion de cytokines) dans la réponse inflammatoire (Gulbransen and Sharkey, 2012; Savidge et al., 2007).

3.3 Corrélations clinico-pathologiques de la constipation dans la MP

3.3.1 Physiopathologie de la constipation dans la MP

La constipation est un des symptômes gastro-intestinaux les plus fréquemment rapportés. Comme dit précédemment il peut survenir des années avant l'apparition des symptômes moteurs, et sa prévalence augmente aussi avec la durée de la maladie. Elle est définie comme une diminution de la fréquence des selles inférieure ou égale à trois par semaine. La physiopathologie à la base de la baisse de fréquence des selles dans la MP paraît liée à une altération de la motilité colique, même si le temps de transit varie selon les études (Bassotti et al., 2000; Edwards et al., 1994; Jost and Schirrigk, 1991, 1994; Jost and Schrank, 1998; Sakakibara et al., 2003). Le temps moyen de transit colique chez les patients parkinsoniens est en général plus de deux fois supérieur à celui des témoins. Une équipe a estimée qu'environ 80 % des patients avaient un temps de transit colique augmenté (Jost and Schirrigk, 1991). Des données manométriques retrouvent également une dysnergie anorectale fréquente, chez 60 % des patients (Bassotti et al., 2000; Sakakibara et al., 2003).

La constipation chronique augmente avec l'âge et semble associée à une perte des neurones dans le plexus myentérique. Une étude chez 16 patients entre 33 et 99 ans a mis en évidence que le nombre de neurones du plexus myentérique avait tendance à décliner avec l'âge, notamment les neurones cholinergiques alors que la proportion des nitrergiques augmente. Les auteurs ne retrouvaient pas de perte neuronale dans le PSM avec l'âge (Bernard et al., 2009; Wiskur and Meerveld, 2010).

3.3.2 La pathologie de type Lewy dans le SNE est fréquente

Alors que la présence des symptômes digestifs dans la maladie était connue dès la première description clinique de la maladie en 1817, les premières constatations de pathologie de Lewy dans le SNE au cours de la MP remontent aux années 1980. Des corps de Lewy ont été mis en évidence initialement par des colorations histochimiques de type hématoxyline et éosine chez un nombre limité de patients dans le plexus myentérique et à un moindre degré dans le plexus sous-muqueux tout le long du tractus digestif de l'œsophage au côlon, avec une prédominance

sur la partie inférieure de l'oesophage (Qualman et al. 1984; Kupsky et al. 1987; Wakabayashi et al. 1988). Ces corps de Lewy ont la forme d'inclusions sphériques ou allongées entourées un halo clair, comme ceux de la substance noire. Leur diamètre est plus petit, allant de 3 à 12 μm , alors que le diamètre des corps de Lewy du SNC varie de 5 à 25 μm ou de 2 à 40 μm dans la substance noire. L'étude au microscope électronique (ME) retrouve une ultrastructure proche de celle écrite pour les corps de Lewy du SNC, une structure avec un cœur dense en ME entourée de filaments disposés radialement. Les filaments sont également semblables à ceux des corps de Lewy de la substance noire, avec un diamètre entre 10 et 12 nm (Adler et al., 2016).

Depuis, plusieurs travaux autopsiques de plus grande envergure, plus sensibles et plus spécifiques utilisant les anticorps anti-synucléine ont été menés afin de mieux caractériser l'atteinte du SNE au cours de la maladie de Parkinson. L'étude de l'Arizona Consortium sur différents organes autopsiés a montré que les lésions du SNE sont présentes chez 11 sur 17 patients parkinsoniens (soit 65 %) et chez 5 des 9 des patients atteints de DCL et sur l'ensemble du tube digestif, du tiers inférieur du de l'oesophage au rectum (Beach et al., 2010). Ces lésions sont toutefois réparties selon un gradient caudo-rostrale, les corps et prolongements de Lewy étant là aussi plus denses dans le 1/3 inférieur de l'oesophage que dans le côlon et plus denses dans le côlon droit que dans le côlon gauche (Beach et al., 2010) de façon inversement corrélée à l'innervation vagale. Outre celle de l'équipe de Beach, d'autres études basées sur des prélèvements autopsiques ou de pièces opératoires chez l'homme ont mis en évidence une synucléinopathie de type Lewy dans l'ENS des patients parkinsoniens utilisant une IHC dirigée contre l' α -synucléine (Gelpi et al., 2014; Gold et al., 2013; Gray et al., 2014).

Cette atteinte pathologique semble précéder le diagnostic clinique de la maladie sur le plan moteur, comme le suggère l'étude de biopsies coliques chez trois patients ayant par la suite développé une MP (Shannon et al., 2012) et offre l'opportunité d'avoir un biomarqueur précoce de la maladie.

La pathologie de Lewy est donc fréquente dans le SNE et pourrait sous tendre les manifestations digestives de la maladie. Néanmoins comme décrit précédemment elle est aussi présente dans

d'autres structures du système nerveux autonome et le lien entre la présence de synucléonopathie et le dysfonctionnement gastro-intestinal n'est pas clair (Figure 12).

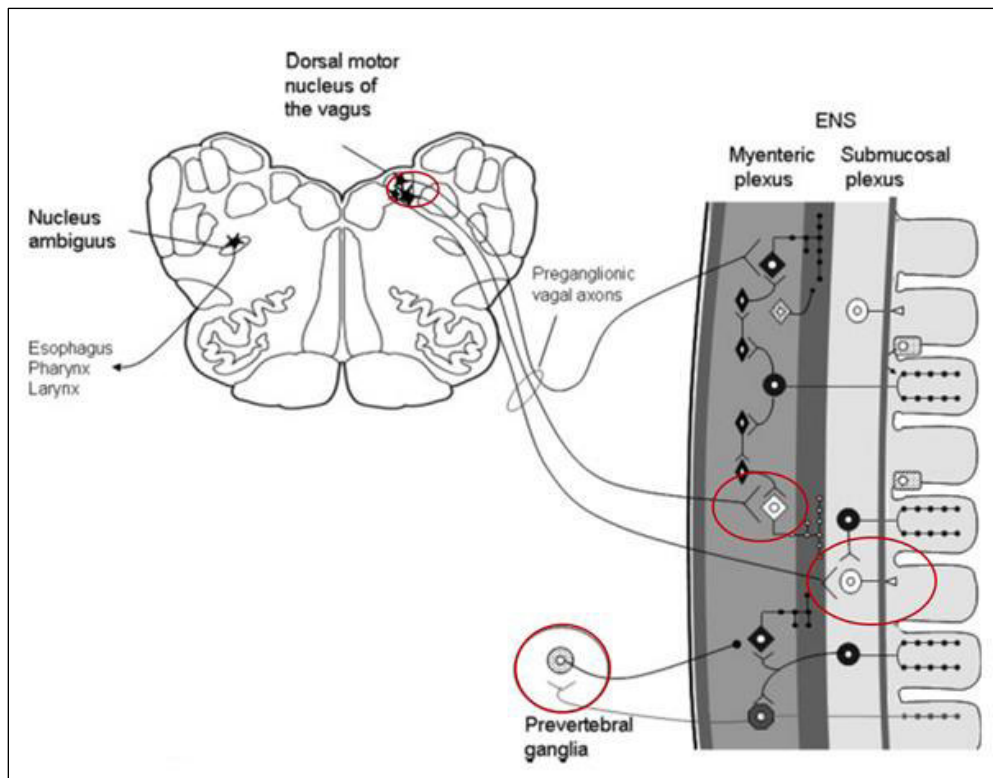


Figure 12. Sites anatomiques en lien avec l'innervation digestive où la pathologie de Lewy a été retrouvée dans la MP.

La pathologie de Lewy a été mise en évidence dans les plexus myentérique et sous-muqueux du SNE, dans les ganglions prévertébraux et dans le noyau dorsal du nerf vague (zones encadrées en rouge). Adaptée de Braak 2006 (Braak et al., 2006b)

3.3.3 Perte neuronale et modification du phénotype neurochimique SNE

Malgré la fréquence des agrégats d' α -synucléine et des troubles gastro-intestinaux dans la maladie de Parkinson, le lien entre la pathologie de Lewy et le dysfonctionnement intestinal n'est pas établi. Des études de corrélations clinico-pathologiques ont été faites dans l'objectif de répondre à cette question et de comprendre le substrat anatomopathologique des troubles gastro-intestinaux dans la maladie de Parkinson. Dans la substance noire les symptômes

cliniques sont en lien avec la perte neuronale plus qu'avec l'intensité des corps de Lewy (Greffard et al., 2010). L'évaluation quantitative des populations neuronales impliquées dans le contrôle de la mobilité intestinale paraît donc indispensable. Des expériences complémentaires sur les prélèvements autopsiques ont montré que la pathologie de Lewy n'affecte pas préférentiellement un type de neurone entérique (Annerino et al. 2012). L'existence d'une perte neuronale dans le SNE au cours de la maladie de Parkinson est encore sujette à débat. Une première étude a montré que 9 sur 11 patients parkinsoniens à un stade avancé avaient une perte neuronale dopaminergique dans le plexus myentérique du côlon ainsi qu'une diminution du taux de dopamine dans la musculature externe du côlon (Singaram et al., 1995). À noter que les auteurs ne retrouvaient pas de différence entre les parkinsoniens et les témoins en terme de nombre de neurones immunoréactifs pour la TH.

Dans le but de mieux caractériser l'atteinte du SNE de nombreux travaux ont utilisé des modèles animaux de maladie de Parkinson. Ceux-ci montrent des résultats divergents. En effet, les travaux réalisés à partir de souris, traitées par le MPTP de façon aiguë ou chronique montrent une perte de neurones dopaminergiques dans les plexus myentérique et sous muqueux du côlon (Anderson et al., 2007; Chaumette et al., 2009) ou bien uniquement dans le duodénum (Natale et al., 2010). Certains retrouvent une diminution du nombre totaux de neurones alors que d'autres ne retrouvent pas de modification (Blandini et al., 2009; Colucci et al., 2012). Les études sur le phénotype entérique d'un autre modèle parkinsonien, des rats chez lesquels on injecte unilatéralement dans le striatum de la 6-OH-dopamine, montrent au contraire une augmentation de l'expression de la TH (Tian et al., 2008; Zhu et al., 2012).

Chez l'homme, les études sont beaucoup moins nombreuses. Deux études récentes se sont intéressées au comptage neuronal des populations du SNE dans la maladie de Parkinson. L'étude de biopsies coliques *in vivo* de patients parkinsoniens a mis en évidence une diminution de 15 % du nombre moyen de neurones par ganglion dans le plexus sous-muqueux mais n'a pas retrouvé de perte des neurones marqués par la TH (Lebouvier et al., 2010a). Néanmoins il n'a pas été trouvé de corrélation entre la densité neuronale et le degré de constipation. Une autre étude, exclusivement sur le plexus myentérique cette fois, portant sur 13 patients parkinsoniens et 12 témoins (sujets indemnes de pathologie neurologique), ne montrent pas de perte

neuronale, ni de modification dans la distribution du phénotype neuronal (Annerino et al., 2012).

Un premier aspect de ma thèse a donc été de poursuivre la caractérisation de l'atteinte neuronale dans le SNE au cours de la MP, en s'intéressant en particulier à la composante catécholaminergique dopaminergique du SNE.

3.4 L' α -synucléine entérique un biomarqueur de la maladie ?

3.4.1 A la recherche d'un biomarqueur précoce dans la MP

L'identification d'un biomarqueur afin de diagnostiquer précocement la MP est un objectif actuel important dans le domaine de la MP. Il aurait plusieurs intérêts. Il permettrait d'une part d'aider au diagnostic parfois délicat en début de maladie. Des études autopsiques ont mis en évidence qu'il y avait un nombre non négligeable d'erreur diagnostique, et ce d'autant plus lorsque le diagnostic était posé précocement au cours de la maladie. Une méta-analyses récente de 11 études utilisant l'examen anatomopathologique comme gold standard met en évidence que les performances diagnostiques cliniques sont en moyenne de 81% et lorsque le diagnostic est posé par des experts de mouvements anormaux. L'exactitude diagnostique est de 79.6 % lors de la consultation initiale et augmente à 83.9% après ajustement lors du suivi médical (Rizzo et al., 2016). Le diagnostic est d'autant plus délicat au début de la maladie avec des valeurs prédictives positives qui chutent à 26% et 53% respectivement lors des 3 et 5 premières années d'évolution de la maladie chez des patients considérés comme parkinsoniens probables, ie avec réponse favorable au traitement dopaminergique (Adler et al., 2014b). L'identification d'un biomarqueur précoce permettrait également de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et permettrait le développement de thérapeutiques visant à ralentir l'initiation et/ou la diffusion de la maladie. Enfin il permettrait de tester l'efficacité des potentiels traitements neuroprotecteurs à un stade précoce de la maladie, avant la survenue des symptômes moteurs et de la mort neuronale cérébrale irréversible.

Malgré les efforts faits dans cet objectif ces dernières années en imagerie, génétique ou biochimie, il n'y a pas à l'heure actuelle de biomarqueur diagnostique validé dans la MP précoce. Il est d'ailleurs vraisemblable qu'une combinaison de biomarqueurs soit plus performante qu'un seul (Mehta and Adler, 2015). Parmi les potentiels biomarqueurs de la maladie l'étude histologique d'organes périphériques connaît un attrait important, car elle est accessible du vivant du patient. De plus elle permettrait potentiellement de détecter la maladie à un stade prémoteur, précoce (Schneider et al., 2015). Dans ce sens Shannon et al. ont pu mettre en évidence une synucléinopathie de type Lewy (STL) dans des biopsies coliques chez trois patients asymptomatiques ayant par la suite développé une MP (Shannon et al., 2012).

Les tissus accessibles actuellement à l'étude dans cette optique sont les biopsies cutanées, du tissu de l'appareil digestif comme les glandes salivaires accessoires, les glandes sous-mandibulaires ou les biopsies coliques. Au laboratoire nous travaillons plus spécifiquement sur le tissu gastro-intestinal, contenant le SNE, qui de par sa complexité fonctionnelle et son lien étroit avec le SNC, nous paraît un tissu privilégié. Je vais donc discuter plus en détail les résultats des études portant sur les biopsies coliques.

3.4.2 L' α -synucléine entérique dans les biopsies coliques : un biomarqueur de la MP performant ?

L' α -synucléine entérique dans les biopsies coliques au cours de la MP : un biomarqueur diagnostique sensible ?

Un nombre croissant de travaux a été réalisé ces dernières années à partir de tissu gastro-intestinal afin de détecter la pathologie de Lewy et d'évaluer si la présence de synucléine entérique pathologique était un biomarqueur de la maladie (pour revue Ruffmann and Parkkinen, 2016; Visanji et al., 2014)). Comme vous pouvez le constatez dans le tableau 2 intégrant toutes les études publiées sur la détection de la STL à l'aide de méthodes IHC dans le tissu colique, les résultats obtenus sont variés. D'après ces travaux la prévalence de la présence d' α -synucléine entérique dans la MP varie de 0 à 100 %. Il existe plusieurs facteurs pouvant expliquer ces divergences de résultats :

- La localisation du prélèvement au sein du tractus digestif est importante. Des études *post mortem* ou *in vivo* ont en effet montré une prévalence de l'agrégation de l' α -synucléine plus importante en partie rostrale comparativement aux sites plus distaux (Beach et al., 2010; Braak et al., 2006b; Lebouvier et al., 2010a; Pouclet et al., 2012a; Wakabayashi et al., 2010).
- Le type de tissu et la prévalence de tissu neural :

Ce facteur est un des éléments déterminants de la variabilité des résultats. On peut distinguer les études faites à partir de tissus prélevés lors d'autopsies et les études faites à partir de tissu prélevé du vivant du patient, par biopsies le plus souvent ou par pièces opératoires. On remarque alors que la prévalence de la STL avoisine les 100 % dans les études basées sur du tissu colique *post mortem*, la prévalence chute et varie énormément lorsqu'il s'agit d'études à partir de biopsies coliques. On imagine aisément que les biopsies coliques ne sont pas toutes identiques, en termes de surface tissulaire analysable et de représentation de structure histologique (muqueuse, sous muqueuse et musculature de la paroi colique), en fonction des études, de l'opérateur ou de la pince utilisée. De plus la qualité du prélèvement et de la préservation structurelle du tissu peut varier, avec l'utilisation d'une pince avec ou sans dard par exemple. On peut mentionner également le nombre de biopsies analysées qui varie selon les études. Les tissus ayant plus de surface de tissu neural, comprenant les plexus sous muqueux ou myentérique auront vraisemblablement plus de chance de présenter une STL détectable.

- Le type d'analyses IHC :
On peut d'emblée distinguer des analyses immunohistochimiques faites sur biopsie entière disséquée (« whole-mount ») ou sur coupe fine (de 4 à 8 μ m d'épaisseur) de biopsie incluse en paraffine.
- La méthode IHC à proprement parler, comprenant les étapes de fixation dans le paraformaldéhyde, l'épaisseur des coupes, le démasquage antigénique, la méthode de révélation du signal, la durée d'incubation et la dilution des anticorps
- La cible antigénique de l' α -synucléine, sous forme phosphorylée ou non et les anticorps utilisés.

- Enfin la subjectivité de l'analyse quantitative, notamment de ce qui est considérée comme étant le marquage de l' α -synucléine physiologique du marquage de la STL et du marquage non spécifique.

L' α -synucléine entérique un biomarqueur de la MP : Spécificité

La prévalence de l' α -synucléine agrégée chez les patients contrôles est aussi très variable selon les études, de 0 % à 52 %. Cet aspect est primordial si on envisage l' α -synucléine entérique en tant que biomarqueur diagnostique de la MP. On peut se demander si les patients témoins considérés cliniquement indemnes de pathologies neurodégénératives qui ont un immunomarquage positif pour l' α -synucléine entérique ne seraient pas des potentiels futurs parkinsoniens. En effet on peut mettre en évidence des corps de Lewy dans le cerveau de patients cliniquement indemnes de maladies neurodégénératives (corps de Lewy incidents). La prévalence des corps de Lewy incidents dans le cerveau augmente avec l'âge et peut atteindre 5 % à 31 % des cas selon les études (Alafuzoff et al., 2008; Elobeid et al., 2016; Jellinger, 2004; Knopman et al., 2003; Parkkinen et al., 2003). Si l'hypothèse de la propagation caudo-rostrale de Braak est exacte on peut donc s'attendre à retrouver de façon fortuite des corps de Lewy incidents dans le tissu digestif chez au moins 10 % des sujets témoins.

Par analogie avec ce qui est observé dans le cerveau, dans lequel seuls 4 % de l' α -synucléine est phosphorylée sur la sérine 129 de façon physiologique (Fujiwara et al., 2002), on peut estimer qu'une faible proportion de l' α -synucléine du SNE sera phosphorylée en conditions physiologiques, l'immunomarquage de l' α -synucléine sous sa forme phosphorylée sur la sérine 129 permet *a priori* de détecter plus spécifiquement l' α -synucléine pathologique. La détection de l' α -synucléine pathologique sous forme phosphorylée sur la sérine 129 ou agrégée chez un grand nombre de sujets sains dans certaines études soulève donc la question de la spécificité de l'immunomarquage et de la subjectivité des quantifications.

3.4.3 L'α-synucléine entérique : un biomarqueur accessible du vivant du patient et analysable à grande échelle ?

Si la présence de synucléine pathologique de type Lewy est un biomarqueur de la MP il offre l'opportunité d'un diagnostic du vivant du patient.

Comme souligné dans le tableau 3, l'α synucléine de type Lewy a pu être mise en évidence du vivant du patient par prélèvement de tissu gastro-intestinal notamment par biopsies de routine par voie endoscopique, que ce soit des biopsies gastroduodénales ou rectocoliques. L'étude réalisée précédemment au laboratoire par Lebouvier et collaborateurs mettait en effet en évidence dans des biopsies coliques de routine une pathologie de type Lewy chez 21 des 29 parkinsoniens et aucun des contrôles. L'analyse IHC était réalisée sur une biopsie entière (« whole-mount ») après microdissection de la sous-muqueuse, et la quantification était basée sur l'analyse de 4 biopsies. Ce type d'approche a l'intérêt de pouvoir analyser l'ensemble du plexus sous-muqueux de la biopsie mais a l'inconvénient d'être difficilement réalisable en routine car la biopsie doit être disséquée rapidement après le prélèvement et nécessite un niveau de technicité et un temps consacré importants, peu compatibles avec une pratique clinique de routine.

Il était alors important de savoir si une analyse immunohistochimique « de routine », sur coupes de tissu inclus en paraffine pouvait aussi mettre en évidence de l'α-synucléine pathologique dans des biopsies digestives. Devant les divergences des résultats et la multiplicité de méthodologie des études publiées, une optimisation des méthodes et une harmonisation des pratiques des centres étaient nécessaires.

Un des objectifs de mon travail de thèse a alors été d'essayer d'identifier des méthodologies d'IHC visant à détecter l'α-synucléine dans des biopsies coliques incluses en paraffine de façon optimale, reproductible à travers les différents laboratoires et d'évaluer les valeurs diagnostiques de ce marquage vis-à-vis de la MP. En parallèle un autre objectif était d'essayer de détecter et d'optimiser la détection de l'α-synucléine par une approche biochimique, complémentaire, et d'évaluer son intérêt dans le développement d'un biomarqueur de la MP.

		MP (n)	Témoins (n)	% des MP	% des témoins	
Wakabayashi et al. 1988	<i>post mortem</i>	7	24	100%	33%	HE
Beach et al. 2010	<i>post mortem</i>	17	23	93%	ns	p- α -syn
Annerino et al. 2012	<i>post mortem</i>	13	12	25-100%	0%	α -syn
Gold et al. 2013	<i>post mortem</i>	10	77	100%	52%	α -syn
Gelpi et al. 2014	<i>post mortem</i>	10	0	80%	na	
Kupsky et al. 1987	biopsies	1	0	100%	na	HE
Lebouvier et al. 2010	biopsies	29	10	72%	0%	p- α -syn
Forsyth et al. 2011	biopsies	9	10	100%	ns	α -syn
Pouclet et al. 2012	biopsies	26	9	23-65%	0%	p- α -syn
Shannon et al. 2012	biopsies	9	24	100%	8%	α -syn
Shannon et al. 2012	biopsies	3	23	100%	0%	α -syn
Pouclet et al. 2012	biopsies	9	0	56%	na	p- α -syn
Devos et al. 2013	biopsies	18	14	67%	ns	p- α -syn
Hilton et al. 2014	biopsies	62	161	0-13%	0%	p- α -syn/ α -syn
Visanji et al. 2015	biopsies	22	11	100%	81%	p- α -syn/ α -syn

Tableau 3 Détection de l' α -synucléine dans le tissu gastro-intestinal dans la MP. Les IHC ont été faites avec des anticorps dirigés contre l' α -synucléine totale (α -syn) ou contre la forme P-Ser129- α -synucléine (p- α -syn). Adapté de Schneider SA, Eur J Neurol. 2015 (Schneider et al., 2015)

RESULTATS

1 Phénotype neurochimique du SNE dans la MP

Evaluation de l'innervation dopaminergique et noradrénergique dans le plexus sous muqueux dans la maladie de Parkinson.

ARTICLE 1. Appraisal of the Dopaminergic and Noradrenergic Innervation of the Submucosal Plexus in PD

Corbillé AG, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P, Lebouvier T.

J Parkinsons Dis. 2014;4(4):571-6. doi: 10.3233/JPD-140422.

Résumé

Le système nerveux entérique (SNE) est composé de réseaux neuronaux, organisés en deux plexus principaux, le plexus myentérique et le plexus sous muqueux PSM, qui sont respectivement impliqués dans la régulation de la motilité et la sécrétion de l'appareil gastro-intestinal. Ces deux plexus sont affectés par la pathologie de Lewy au cours de la MP, suggérant que les troubles gastro-intestinaux observés chez les patients parkinsoniens comme la constipation soient liés à une atteinte neurochimique de ces plexus entériques. Une étude immunohistochimique récente réalisée à partir de prélèvements autopsiques n'a pourtant pas retrouvé de perte neuronale dans le PM, que ce soit des neurones totaux ou dopaminergiques, mais le PSM n'a pas été analysé.

En ce qui concerne le PSM, une telle étude n'a pas été faite. Les travaux réalisés au laboratoire ont montré que 60 % des fibres nerveuses dans lesquelles la pathologie de Lewy était mise en évidence exprimaient la tyrosine hydroxylase et avaient donc un profil catécholaminergique. Dans le SNE les neurones catécholaminergiques correspondent soit à la population dopaminergique intrinsèque, potentiellement vulnérable au processus pathologique soit à la population noradrénergique extrinsèque. Nous avons donc cherché à évaluer dans le PSM

entérique de patients parkinsoniens la perte neuronale totale et plus précisément catécholaminergique.

Dans cet objectif nous avons comparé la densité neuronale totale et catécholaminergique par IHC utilisant un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (TH) et quantifié l'expression protéique de marqueurs neuronaux dopaminergiques et noradrénergiques par western blot utilisant des anticorps dirigés contre le transporteur de la dopamine (DAT) et la dopamine beta-hydroxylase (DBH) respectivement, dans des biopsies coliques obtenues chez 35 patients parkinsoniens et 10 témoins.

Nous n'avons observé aucune différence significative dans la densité des neurones dopaminergiques ni dans les niveaux de marqueurs dopaminergique et noradrénergique dans les biopsies coliques chez les patients parkinsoniens par rapport aux témoins.

Nos résultats indiquent qu'il n'y a aucune preuve de perte neuronale dopaminergique ou noradrénergique dans le PSM dans la MP, suggérant ainsi que la neuropathologie dans les neurones sous-muqueux est peu susceptible d'être un facteur causal de la dysfonction gastro-intestinale de la MP.

Cet article a conduit à un éditorial de Pfeiffer dans Journal of Parkinson Disease (Pfeiffer, 2014).

Research Report

Appraisal of the Dopaminergic and Noradrenergic Innervation of the Submucosal Plexus in PD

Anne-Gaëlle Corbillé^{a,b,c}, Emmanuel Coron^{a,b,d,e}, Michel Neunlist^{a,b,e},
Pascal Derkinderen^{a,b,c,d,l,*} and Thibaud Lebouvier^{a,b,c,d,l}

^aInserm U913, Nantes, France

^bUniversity Nantes, Nantes, France

^cCHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, France

^dInserm CIC 00-04, Nantes, France

^eCHU Nantes, Department of Neurology, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

Abstract.

Background: The principal components of the enteric nervous system (ENS) are two neuronal networks, the myenteric and submucosal plexus (SMP), which are primarily involved in the regulation of gastrointestinal (GI) motility and secretion, respectively. These two plexus are made up of intrinsic neurons receiving input from the extrinsic sympathetic and parasympathetic innervation of the gut. Both the intrinsic and extrinsic innervations of the gut are affected by Lewy pathology in Parkinson's disease (PD). A recent autopsy survey indicated that there was no global or dopaminergic loss in the myenteric plexus in PD but the SMP was not examined.

Objective: The aim of the present work was to compare the relative abundance of dopaminergic and noradrenergic neurons in colonic biopsies between PD patients and control individuals.

Methods: Colonic biopsies were taken during the course of a colonoscopy in 35 PD patients and 10 control subjects. Density of dopaminergic neurons and expression of the dopaminergic and noradrenergic markers were analyzed by tyrosine hydroxylase (TH) immunofluorescence and Western blot using anti-dopamine transporter (DAT) and anti-dopamine beta-hydroxylase (DBH), respectively.

Results: No significant differences were observed in the density of dopaminergic neurons and in the expression levels of dopaminergic and noradrenergic markers in colonic biopsies from PD patients as compared to controls.

Conclusion: Our results indicate that there is no evidence of dopaminergic and noradrenergic neuronal loss in the SMP in PD, thereby suggesting that neuropathology in submucosal neurons is unlikely to be a causative factor for GI dysfunction in PD.

Keywords: Parkinson's disease, enteric nervous system, submucosal plexus, dopamine, autonomic nervous system

INTRODUCTION

The major functions of the gastrointestinal (GI) tract, such as motility and secretion, are controlled by intrinsic and extrinsic innervation [1]. Extrinsic innervation comprises both afferent and efferent pathways of the parasympathetic and sympathetic nervous system, while the intrinsic innervation consists of the

^lEqual contributors.

*Correspondence to: Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. Tel.: +33 0 240087924; Fax: +33 0 240087506; E-mails: derkinderen@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr.

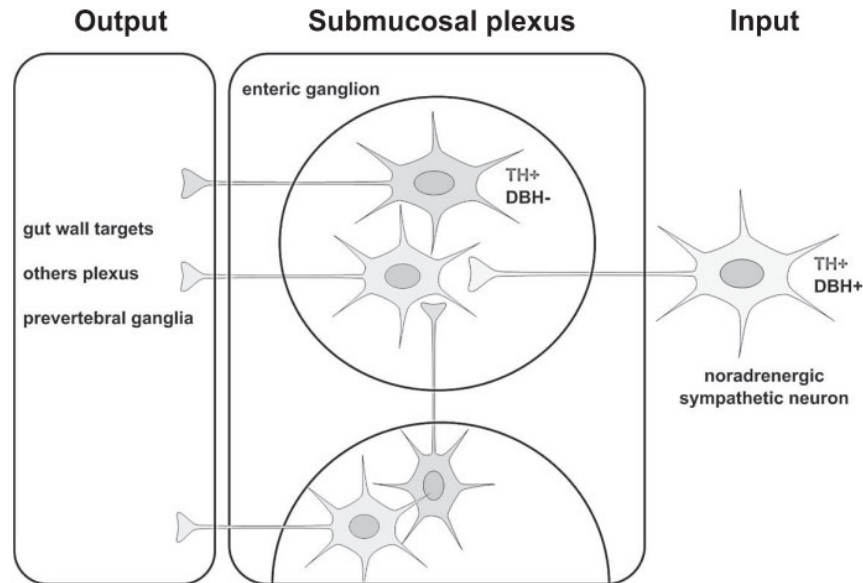


Fig. 1. TH-immunoreactive neurons and fibers in the human submucosal plexus. Intrinsic TH-immunoreactive neurons of the submucosal plexus gut are characterized by their content of TH but absence of DBH and are therefore dopaminergic. Prevertebral sympathetic neurons are characterized by the presence of TH and DBH and are extrinsic noradrenergic. TH-immunoreactive fibers in the SMP originate either from noradrenergic extrinsic neurons or from dopaminergic neurons whose cell bodies are located in neighboring ganglia.

ganglia of the myenteric and submucosal plexus (SMP) that constitute the enteric nervous system (ENS) [1]. Intrinsic enteric neurons can be classified according to their neurochemical phenotype, which reflects their content in intercellular messenger or neurotransmitter [2].

In all regions of the human GI tract, the vast majority of enteric neurons are cholinergic [3]. A relatively small proportion of intrinsic enteric neurons express tyrosine hydroxylase (TH) in both plexus. These TH-immunoreactive neurons have been previously reported to lack Dopamine beta-hydroxylase (DBH), indicating that they are dopaminergic rather than noradrenergic [3]. These dopaminergic neurons are distributed along an oral-aboral gradient, accounting for 14–20% of the total enteric neurons in the upper GI tract, while their proportion decreases to 1–6% in the lower small intestine and large intestine [3]. Besides TH-immunoreactive cell bodies, the myenteric and submucosal plexus also contain TH-positive nerve fibers. These TH-immunoreactive fibers are either dopaminergic, originating from other

neighboring enteric ganglia or noradrenergic, originating extrinsically from the sympathetic paravertebral ganglia (Fig. 1) [3].

Both the intrinsic and extrinsic innervations of the gut are affected by the pathological process in PD. Lewy bodies and Lewy neurites, the pathological hallmarks of PD, have been found in the submucosal [4–8] and myenteric plexus [7–11]. Likewise, several reports have consistently shown that the paravertebral sympathetic ganglia, including the coeliac ganglia, exhibited Lewy pathology [10, 12, 13]. Co-localization of Lewy pathology with TH have been reported to occur at a relative low frequency in the myenteric plexus (3%) [11] and at much higher percentages (above 50%) in the SMP [4, 14]. Recent autopsy findings demonstrated the absence of total and dopaminergic neuronal loss in the myenteric plexus of PD [11]. We found previously a 15% significant decrease in the submucosal neuronal density in colonic biopsies from PD patients but the proportion of TH-immunoreactive neurons was not evaluated in this study [4]. We therefore undertook the present study to compare the relative abundance

of dopaminergic and noradrenergic neurons in colonic biopsies between PD patients and control individuals.

PATIENTS AND METHODS

Subjects and colonic biopsies

Details of patient selection and study design have been published previously [4, 15]. Briefly, 35 PD and 10 healthy subjects aged 40–80 years patients were enrolled. Diagnosis of PD was made according to the United Kingdom PD Survey Brain Bank. Healthy patients requiring a total colonoscopy for colorectal cancer screening were included as controls. Four colonic biopsies were taken during the course of a colonoscopy in both PD patients and controls. Samples were immediately immersed in liquid nitrogen and frozen at -80°C for further analysis by Western blot or at 4°C saline solution for immunohistochemistry. The study protocols were approved by the local Committee on Ethics and Human Research and registered on ClinicalTrials.gov (Enteropark NCT00491062 and ColoBioParker NCT01353183). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Immunohistochemistry, Western blot and neuronal cell counting

For immunohistochemistry, biopsies were transferred in a Sylgard-coated Petri dish filled with 4°C Hank's Buffered Salt Solution then stretched and pinned flat under a stereomicroscope with the mucosa oriented on the bottom of the dish [16]. The submucosa was mechanically separated from the mucosa with watchmaker's forceps. The submucosa was fixed in phosphate buffered saline (PBS) with 4% (v/v) paraformaldehyde for 3 h at room temperature or overnight at 4°C . After fixation, the samples were rinsed 3 times for 10 min with PBS and kept at 4°C in PBS with 1% (v/v) sodium azide (PBS/NaN₃) until further use.

Each whole-mount preparation of submucosa obtained from a single biopsy was permeabilized for 3 hours in PBS/NaN₃ containing 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) horse serum, and then incubated with the antibodies against tyrosine hydroxylase (TH, 1:500, Pel-Freez Biologicals, AR, USA) and neurofilament 220 kDa (NF, 1:250, Millipore, Molsheim, France). Suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 and 647 were used (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Specimens of submucosa were

viewed under a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope (Zeiss, Thornwood, NY, USA).

For neuronal cell counting, immunoreactive neurons for TH and NF were counted in all available ganglia of the sample. The relative proportion of TH-immunoreactive neurons was expressed as a percentage of the total number of neurons determined with NF immunostaining. The mean area of the submucosal samples did not differ significantly between patients and controls (data not shown).

Western blot analysis was performed as we previously described [16, 17] using the following primary antibodies: anti-DAT (1:1000, #D6944, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-DBH (1:1000, AB1536, Millipore), anti-beta-actin (1:5000, Sigma) and anti protein gene product 9.5 (PGP 9.5) (1:1000, Ultraclean, Cambridge, UK).

Statistical analysis

All data are given as the mean $\pm$ SEM. The analyses were conducted with GraphPad software 5.00 version (San Diego California, USA). For comparisons of means between groups, non-parametric two-tailed Student's *t*-test (Mann Whitney test) was performed. Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Age and sex did not differ significantly between PD patients and control subjects (mean age was 62.8 ± 5 in PD and 61.3 ± 9 in controls, $p = 0.59$; the percentage of male subjects was 55% and 50%, respectively).

We have previously shown that virtually all human colonic submucosal neurons were labeled using an anti-NF220 antibody, allowing the use of NF-immunostaining for neuronal count (Fig. 2A) [4]. As aforementioned all intrinsic monoaminergic neurons in the human colon SMP are immunoreactive for TH but not for DBH, suggesting that they are dopaminergic [3]. We therefore analyzed the dopaminergic population using TH and NF double immunolabeling. Most ganglia were devoid of TH-immunoreactive neurons and contained only TH-immunoreactive fibers that either originate from other ganglia or from the extrinsic sympathetic innervation (Figs. 1 and 2A, B) while rare isolated TH-immunoreactive cell bodies were observed in some ganglia (Figs. 1 and 2C, D). Quantification showed that the proportion of NF-immunoreactive neurons that were also immunoreactive for TH was comparable between controls

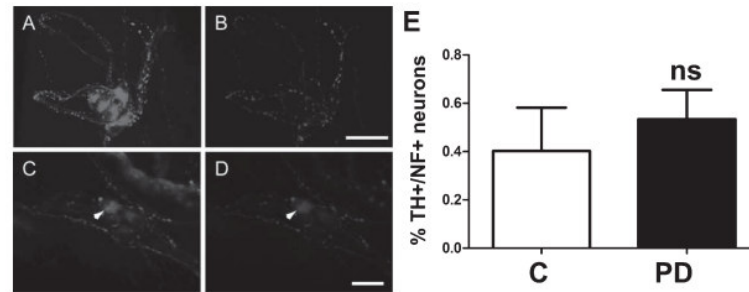


Fig. 2. Proportion of TH immunoreactive neurons in the submucosal plexus of PD patients. Double labeling with antibodies against NF (A and C) and TH (B and D) showed that rare submucosal neurons were TH-immunoreactive (C and D, arrowheads). Scale bar: 30 μ m. (E) No variation in the proportion of TH-immunoreactive submucosal neurons in PD patients as compared to controls (means $\pm$ SEM; $n = 10$ for controls and 29 for PD, ns: non-significant).

and PD cases (Fig. 2E). The low proportion of TH-immunoreactive neurons led us to use Western blotting instead of immunohistochemistry for quantification in subsequent experiments. To analyze in more details the catecholaminergic populations, antibodies against DAT and DBH, which identify specifically the dopaminergic and noradrenergic neurons respectively, were used. No change in the expression of levels of DAT and DBH was observed in PD cases as compared to control subjects, either after normalizing to β -actin (Fig. 3A, B) or to the neuronal marker PGP9.5 (data not shown). Altogether these results suggest that there is no submucosal catecholaminergic neuronal loss in PD.

DISCUSSION

In humans, enteric dopaminergic neurons are distributed along an oral aboral gradient [3]. While being relatively abundant in both plexus of the upper GI tract accounting for 15% of the total enteric neurons, their proportion dwindles to 0–2% in the SMP of the large intestine [3]. Our results, by showing that the proportion of dopaminergic neurons in the colonic SMP in both control and parkinsonian subjects is approximately 0.5%, as measured by immunoreactivity for TH, are therefore in accordance with previous reports.

Consistent with TH-immunohistochemistry results, DAT Western blot analysis showed no significant difference between PD patients and controls. These results and the previous ones obtained by Annerino et al. [11] show that PD is not associated with enteric dopaminergic neuronal loss, either in the submucosal or myenteric plexus. At first glance, they

sharply contrast with a widely cited paper that reported a significant and a noticeable (albeit not significant) decrease in the proportion of dopaminergic neuron in the colonic myenteric and submucosal plexus of PD patients, respectively [18]. This study primarily used dopamine immunohistochemistry for the identification of dopaminergic neurons, a method that has not been validated for the staining of dopaminergic neurons. When TH immunohistochemistry was used in the same study, no difference was noted between PD and controls [18], suggesting that the dopaminergic neuronal loss they observed was artifactual.

We have previously observed that more than half of Lewy neurites in the SMP colocalized with DBH and were perivascular [4]. This implies that a significant proportion of the submucosal Lewy pathology is in fact extrinsic, reflecting the involvement of the sympathetic autonomic nervous system by the pathological process in PD [10, 12, 13]. We showed in the current study that the expression levels of DBH were unchanged in the submucosal samples from PD patients, suggesting that the occurrence of Lewy pathology in the sympathetic innervation of the gut is not associated with neuronal loss. It should be noted, however, that our ability to detect a statistical difference may have been limited by the relatively small sample size, especially regarding the number of control subjects.

GI dysfunction occurs in almost every PD patient at some point. Symptoms such as nausea as a result of impaired gastric emptying, and bowel dysfunction, including both reduced bowel movement frequency and difficulty defecating, are among the most common non-motor symptoms of the disease [19]. Despite the frequency of GI dysfunction and enteric neuropathology in PD, it is not clear whether there is a causal

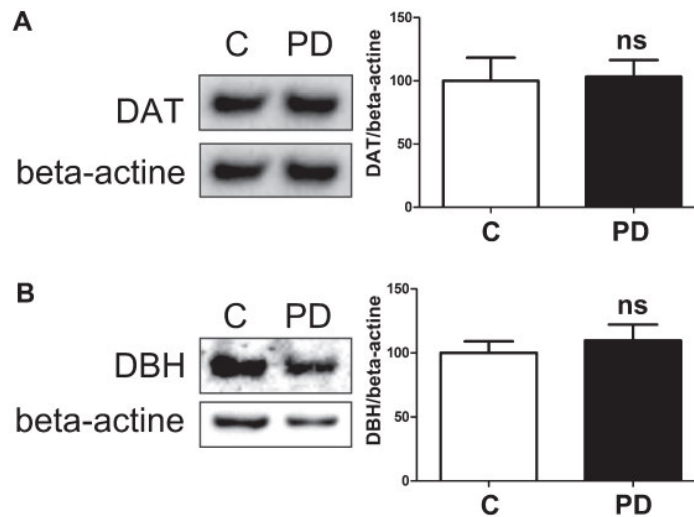


Fig. 3. Expression levels of DAT and DBH in colonic biopsies of PD patients. On the left, representative X-Ray films showing the expression levels of DAT (A) and DBH (B) in colonic biopsies of controls and PD patients. Beta-actin was used as a loading control. No significant changes were found in DAT and DBH expression levels between controls and PD patients (means $\pm$ SEM; $n = 10$ for controls and 16 for PD, ns: non-significant).

relationship between the two findings, and precise clinicopathological correlation studies are still lacking [20]. The absence of overt neuronal loss and changes in neurochemical phenotype in both the myenteric and the submucosal plexus [4, 11] suggest that the pathophysiological mechanisms underlying these GI manifestations are likely to be multifaceted reflecting not only the involvement of the intrinsic innervation of the gut, but also its extrinsic inputs. Among these extrinsic structures, the dorsal motor nucleus of the vagus has received great attention as it is almost consistently affected in PD, displaying both neuronal loss and Lewy pathology [21]. Transgenic animals overexpressing α -synuclein in the dorsal motor nucleus of the vagus exhibit GI dysfunction similar to that seen in PD in the absence of α -synuclein pathology in enteric neurons [22], further reinforcing a possible role for this nucleus in PD-related GI disorders [23]. Nevertheless, the respective contributions of the dorsal motor nucleus of the vagus and intrinsic enteric innervation in PD-associated dysfunction still remain to be determined. One might therefore suggest that this will be achieved in the near future by using a combination of functional imaging techniques to monitor dorsal motor nucleus of the vagus activity [24] and full thickness GI biopsies

to assess pathological changes in the entire gut wall in living patients [25].

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work was supported by a biomarker grant from the Fox Foundation and by a grant from Nantes University Hospital (Direction de la Recherche Clinique). Work in our lab is supported by France Parkinson, CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens), ADPLA (Association des Parkinsoniens de Loire Atlantique), FFPG (Fédération française des groupements parkinsoniens) and Parkinsoniens de Vendée. AGC is a recipient of poste d'accueil Inserm.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- [1] Furness JB (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9, 286-294.

- [2] Hansen MB (2003) The enteric nervous system I: Organisation and classification. *Pharmacol Toxicol*, **92**, 105-113.
- [3] Anlauf M, Schafer MK, Eiden L, & Weihe E (2003) Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: Cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol*, **459**, 90-111.
- [4] Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, Nguyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, & Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*, **5**, e12728.
- [5] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Varannes des SB, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, & Derkinderen P (2012) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **45**, 305-3059.
- [6] Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, & Kordower JH (2012) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*, **27**, 709-715.
- [7] Braak H, de Vos RA, Bohl J, & Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*, **396**, 67-72.
- [8] Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, & Ikuta F (1988) Parkinson's disease: The presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol*, **76**, 217-221.
- [9] Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, & Hamilton SR (1984) Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology*, **87**, 848-856.
- [10] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Ii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, & Walker DG (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, **119**, 689-702.
- [11] Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, & Greene JG (2012) Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol*, **124**, 665-680.
- [12] Orimo S, Amino T, Itoh Y, Takahashi A, Kojo T, Uchihara T, Tsuchiya K, Mori F, Wakabayashi K, & Takahashi H (2005) Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. *Acta Neuropathol*, **109**, 583-588.
- [13] Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Martí MJ, Hernández I, Valdeoriola F, Reñé R, & Ribalta T (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord*, doi: 10.1002/mds.25776
- [14] Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, & Ikuta F (1990) Parkinson's disease: An immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol*, **79**, 581-583.
- [15] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Rouaud T, Flamant M, Toulgoat F, Roy M, Vavasseur F, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & Derkinderen P (2012) Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*, **18**, 893-895.
- [16] Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & Derkinderen P (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*, **22**, e11-e14.
- [17] Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM, & Derkinderen P (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem*, doi: 10.1111/jnc.12742
- [18] Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA, Torbey C, Sengupta A, Pfeiffer R, & Quigley EM (1995) Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet*, **346**, 861-864.
- [19] Cloud LJ, & Greene JG (2011) Gastrointestinal features of Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **11**, 379-384.
- [20] Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & De Giorgio R (2011) Parkinson disease: The enteric nervous system spills its guts. *Neurology*, **77**, 1761-1767.
- [21] Benarroch EE, Schmeichel AM, Sandroni P, Low PA, & Parisi JE (2006) Involvement of vagal autonomic nuclei in multiple system atrophy and Lewy body disease. *Neurology*, **66**, 378-383.
- [22] Noorian AR, Rha J, Annerino DM, Bernhard D, Taylor GM, & Greene JG (2012) Alpha-synuclein transgenic mice display age-related slowing of gastrointestinal motility associated with transgene expression in the vagal system. *Neurobiol Dis*, **48**, 9-19.
- [23] Greene JG (2014) Causes and consequences of degeneration of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, **21**, 649-667.
- [24] Macefield VG, & Henderson LA (2010) Real-time imaging of the medullary circuitry involved in the generation of spontaneous muscle sympathetic nerve activity in awake subjects. *Hum Brain Mapp*, **31**, 539-549.
- [25] Neunlist M, Coquenlorge S, Aubert P, Duchalais-Dassonneville E, Bruley des Varannes S, Meurette G, & Coron E (2011) Colonic endoscopic full-thickness biopsies: From the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission. *Gastrointest Endosc*, **73**, 1029-1034.

Commentary

Parkinson's Disease and the Gut: 'The Wheel Is Come Full Circle'

Ronald F. Pfeiffer*

University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, USA

In summarizing his thoughts regarding the possible pathophysiology of the disease process he had just described in his 1817 treatise and which would ultimately bear his name, James Parkinson commented:

"Although unable to trace the connection by which a disordered state of the stomach and bowels may induce a morbid action in a part of the medulla spinalis, yet taught by the instruction of Mr. Abernethy, little hesitation need be employed before we determine on the probability of such occurrence" [1].

It is both ironic and remarkable that now, almost 200 years later, the question of interaction between the gut and the brain in Parkinson's disease (PD) has resurfaced to become the subject of a veritable tsunami of fascinating and tremendously important research that has potential ramifications not only for understanding the pathophysiology of PD but also for its treatment and even its diagnosis.

During the past 30 years, gastrointestinal (GI) dysfunction has gained recognition as one of the more frequent and troublesome nonmotor features of PD [2, 3] and pathology within the enteric nervous system (ENS), including Lewy body formation and alpha-synuclein deposition, has been identified as part of the disorder [4–6]. Loss of dopamine neurons within the ENS also has been reported [6]. Braak et al. have proposed that PD actually has its genesis within the ENS and spreads from there via the vagus nerve to the central nervous system (CNS), initially establishing a beach-

head in the medulla within the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) and progressing from there up the brainstem, eventually to reach the substantia nigra and beyond [7, 8]. It has further been proposed that the spread of pathology in PD may be from neuron to neuron in a prion-like process [9, 10]. The idea that PD might have its origin within the ENS has received epidemiologic support from findings that bowel dysfunction may become evident in individuals as much as 12–20 years before the classic motor features of PD make their appearance [11, 12]. Thus, the supposition has developed that the GI symptoms of PD and their development early in the course of PD are due to the involvement of the ENS during what is now labelled the premotor phase of PD.

However, things are not always as straightforward as they seem. The current report by Corbillé and colleagues [13], coupled with an earlier report by Annerino et al. [14], seem to clearly indicate that there is no actual loss of neurons in either the submucosal or myenteric plexus of the ENS in PD. Both groups of authors assert that the loss of dopamine neurons in the myenteric plexus reported by Singaram et al. (full disclosure: I was one of the et al.) almost 20 years ago was artifactual. They may be correct, but it may be worth noting that the patients studied by Singaram et al. were individuals with very severe constipation – so severe that 9 of the 11 had undergone colectomy because of intractable constipation (colon tissue from the other two was obtained at autopsy) – and thus they may not be comparable to the patients studied more recently in whom the presence and degree of constipation was not characterized but presumably was less severe. It also seems peculiar that an artifact would affect only the PD patients.

*Correspondence to: Ronald F. Pfeiffer, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, USA. E-mail: rpfeiffe@uthsc.edu.

Nevertheless, the recent reports seem quite convincing and thus call into question the origin of GI symptoms in PD. Do they arise from damage to the ENS or are they based on damage to the DMV and other structures within the CNS? The reports by Corbillé et al. and others suggest that the GI symptoms of PD may primarily be driven by changes within the CNS, although dysfunction within the ENS but without neuronal death also might play a role. Research using animal models of PD, such as the recent report of Zheng et al. in which 6-hydroxydopamine-induced lesions of the substantia nigra resulted in impaired gastric motility and impaired gastric emptying that could be prevented by vagotomy also support the conclusion that GI dysfunction in PD is the result of CNS damage [15]. But how then does one explain the emergence of GI dysfunction in PD-destined individuals as much as two decades before development of motor features and what is one to make of the deposition of alpha-synuclein within the ENS early in the course of PD?

Although the work by Corbillé and colleagues argues against neuronal demise in the ENS as an explanation for GI symptoms in PD, it certainly does not contradict the presence of pathology within the ENS in PD, nor does it negate the idea that the ENS is the birthplace of PD, even if it is not responsible for the GI symptoms that characterize the disorder. In fact, work from the same group of authors has charted new pathologic territory by reporting the presence of inflammation, with elevated levels of pro-inflammatory cytokines and evidence of glial dysregulation, within the ENS in colonic biopsies taken from PD patients [16, 17]. This, coupled with reports by others of increased colonic permeability in a mouse model of PD [18], provides additional fuel for the hypothesis proposed by Braak et al. that PD does indeed originate within the ENS and that the smoldering inflammatory fire triggered there by a still unidentified pathogen induces further changes that slowly but surely spread to ultimately involve the CNS and produce the classic features of PD. Thus, the wheel comes full circle back to Dr. Parkinson. However, if this is true, why neurons within the ENS do not die remains an intriguing mystery and there is most certainly more of the story yet to unfold.

REFERENCES

- [1] Parkinson J (1817) An essay on the shaking palsy. London: Whittingham and Rowland.
- [2] Pfeiffer RF (2003) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, **2**, 107-116.
- [3] Pfeiffer RF (2011) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **17**, 10-15.
- [4] Kupsky WK, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R & Cote LJ (1987) Parkinson's disease and megacolon: Concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology*, **37**, 1253-1255.
- [5] Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E & Ikuta F (1990) Parkinson's disease: An immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol*, **79**, 581-583.
- [6] Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA, Torbey C, Sengupta A, Pfeiffer R & Quigley EM (1995) Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet*, **346**, 861-864.
- [7] Braak H, Rüb U, Gai WP & Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*, **110**, 517-536.
- [8] Braak H, de Vos RA, Bohl J & Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*, **396**, 67-72.
- [9] Olanow CW & Prusiner SB (2009) Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 12571-12572.
- [10] Olanow CW & Brundin P (2013) Parkinson's disease and alpha synuclein: Is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord*, **28**, 31-40.
- [11] Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, Grandinetti A, Blanchette PL, Popper JS & Ross GW (2001) Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*, **57**, 456-462.
- [12] Savica R, Carlin JM, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Maraganore DM, Bharucha AE & Rocca WA (2009) Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology*, **73**, 1752-1758.
- [13] Corbillé A-G, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P & Leboviev T (2014) Appraisal of the dopaminergic and noradrenergic innervation of the submucosal plexus in PD. *J Parkinsons Dis*, **4**, 571-576.
- [14] Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG & Greene JG (2012) Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol*, **124**, 665-680.
- [15] Zheng LF, Song J, Fan RF, Chen CL, Ren QZ, Zhang XL, Feng XY, Zhang Y, Li LS & Zhu JX (2014) The role of the vagal pathway and gastric dopamine in the gastroparesis of rats after a 6-hydroxydopamine microinjection in the substantia nigra. *Acta Physiol (Oxf)*, **211**, 434-446.
- [16] Devos D, Leboviev T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Coron E, des Varannes SB, Naveilhan P, Nguyen J-M, Neunlist M & Derkinderen P (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **50**, 42-48.
- [17] Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM & Derkinderen P (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem*, **130**, 805-815.
- [18] Kelly LP, Carvey PM, Keshavarzian A, Shannon KM, Shaikh M, Bakay RAE & Kordower JH (2014) Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord*, **29**, 999-1009.

2 L'α-synucléine entérique un biomarqueur de la MP ?

« La source de nos découragements est souvent dans notre impatience. »

Ernest Naville

2.1 Apport de la détection de l'α-synucléine entérique dans les biopsies coliques incluses en paraffine

2.1.1 Expression de l'α-synucléine phosphorylée sur la Ser129 dans des biopsies coliques incluses en paraffine dans la MP et chez des témoins

(Données non publiées)

Introduction

De nombreuses études suggèrent que l'α-synucléine dans le SNE pourrait être un biomarqueur de la MP, mais les résultats sont parfois divergents. Dans le tissu gastro-intestinal, les études estiment la prévalence de l'α-synucléine entérique chez les MP entre 50 et 100 % et chez les sujets témoins entre 0 et 50 %. (Schneider et al., 2016). La variabilité des résultats est liée à des différences dans les méthodologies d'IHC utilisées dont les anticorps, mais aussi au site de prélèvement du tissu le long du tractus et à la population étudiée.

Les travaux réalisés au laboratoire retrouvaient une prévalence de la STL chez les parkinsoniens de l'ordre de 70% et nulle chez les témoins dans le SNE issu de biopsies coliques disséquée (Lebouvier et al., 2010a). Dans cette étude, l'analyse IHC a été réalisée à partir de tissu « whole-mount » après dissection du PSM de l'ensemble de la biopsie, ce qui permet d'augmenter la quantité de tissu neuronal analysable mais qui est peu adapté au développement d'un biomarqueur à utiliser à plus grande échelle.

Nous avons donc cherché à réévaluer la prévalence de la STL entérique dans le SNE des biopsies coliques obtenues chez les mêmes patients, mais à partir de biopsies incluses en paraffine et conservées au laboratoire d'anatomopathologie. De la même manière que l'étude réalisée à partir des biopsies « whole-mount », nous avons réalisé une IHC utilisant un anticorps dirigé contre l' α -synucléine phosphorylée (P-Ser129- α -synucléine). Nous avons réalisé l'IHC sur des biopsies coliques humaines obtenues de l'étude « Entéropark ». Nous avons ainsi étudié les biopsies coliques de 8 sujets témoins et de 28 patients parkinsoniens.

Méthodes

Les biopsies coliques de routine ont été obtenues à l'aide d'une pince à biopsie standard sans aiguille lors d'une coloscopie au niveau du colon descendant et du colon ascendant selon le protocole de l'étude clinique « Entéropark » (NCT00491062 sur le registre de clinicaltrials.gov). Dans notre étude, deux biopsies par patient ont été analysées. Elles ont été fixées dans de la formaline 10% pendant 48h puis incluses en paraffine. Des sections de 4 μ m ont été obtenues à l'aide d'un microtome Leica RM125. Les coupes ont été déparaffinées puis hydratées par des bains successifs de xylène et d'alcool en pourcentage décroissant. Elles ont été incubées pendant 20 minutes avec de l'acide formique à 98%, puis rincées abondamment à l'eau. Le reste de l'IHC (prétraitement par acide citrique, inhibition des peroxydases endogènes par H₂O₂, incubation avec les anticorps primaires puis secondaires anti-souris couplés à l'HRP et rinçages ont été effectuées de façon automatisée avec l'automate Bond III (Leica). Pour les IHC avec double marquage en DAB et en Red, le kit ChromoPlex 1 Dual Detection (Leica) a été utilisé. Le montage a été effectué sur lames Superfrost Plus (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) avec du milieu de montage Eukitt.

Les anticorps utilisés étaient l'anti-P-Ser129- α -synucléine (monoclonal de souris, Clone pSyn#64, Wako, Japon), dilution 1 :30 000 et l'anticorps anti-PGP9.5 (polyclonal de lapin, Ultraclone limited), dilution 1 : 10 000.

Les coupes ont été observées au grossissement optique X20 (microscope Leica) et une cotation semi quantitative du marquage a été effectuée en aveugle, prenant en compte l'intensité du marquage sur l'ensemble de la coupe : marquage absent, léger, modéré ou intense.

Les analyses statistiques ont été effectuées sur Prism (version 5.00). Le seuil de significativité retenu pour α était de 5%. Les comparaisons entre les groupes témoins et parkinsoniens ont été faites par le test t non paramétrique, et l'analyse du nombre de biopsies positives en fonction du statut parkinsonien ou témoin par un test chi-2.

Résultats :

Données démographiques :

Les témoins et les parkinsoniens avaient un âge comparable, de $60 \pm 2,6$ et $63 \pm 11,9$ ans ($p=0,19$). La durée de la maladie chez les parkinsoniens était de 9,8 ans et tous les parkinsoniens avaient une constipation définie par les critères de Rome III.

Nous avons au préalable vérifié la présence de tissu neuronal dans les coupes en faisant des IHC utilisant des marqueurs neuronaux (anti PGP9.5 ou anti Tubuline III). Nous avons pu observer sur toutes les coupes testées la présence d'un marquage neuronal ($n=5$). Ce marquage révélait le plus souvent la présence de fibres nerveuses contenues dans la muqueuse (lamina propria), et plus rarement, pour les quelques coupes contenant de la sous muqueuse, la présence de corps cellulaires des plexus sous muqueux (illustration en figure 13).

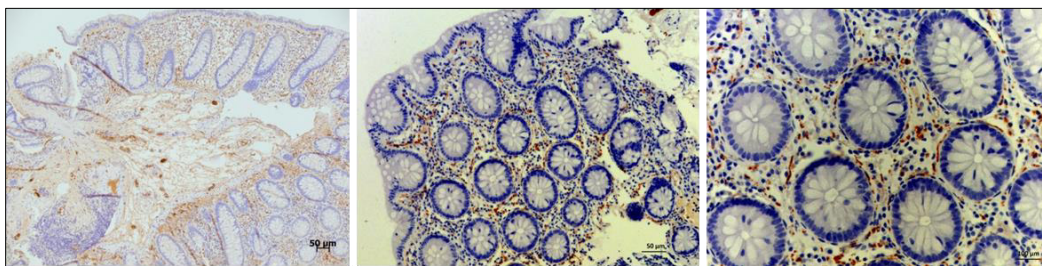


Figure 13. Illustration d'un immunomarquage anti PGP9.5 sur des biopsies coliques humaines.

A gauche, à faible grossissement, noter la présence de corps cellulaires au sein de la sous muqueuse correspondant aux plexus sous muqueux d'une biopsie colique.

En B et C (moyen et fort grossissements) : présence de nombreuses fibres nerveuses dans la muqueuse d'une autre biopsie colique.

Prévalence du marquage de l'α-synucléine phosphorylée dans les biopsies coliques chez les patients parkinsoniens et chez les témoins

Ensuite nous avons réalisé une IHC utilisant un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de l'α-syn sur la sérine 129, en utilisant un prétraitement par acide formique. La mise au point de la technique montrait un immunomarquage globalement similaire que le prétraitement ait été fait avec l'acide formique ou avec la protéinase K (données préliminaires, non montrées).

L'analyse semi-quantitative du marquage montre un marquage présent chez 7 sur 16 (44 %) biopsies de témoins et chez 38/56 (68 %) biopsies des parkinsoniens, sans différence statistiquement significative ($p=0,08$).

Néanmoins le nombre de biopsies positives (ie ayant au moins un marquage discret) rapporté au nombre des biopsies étudiées (deux) par patient est statistiquement associé au statut parkinsonien ou non (test χ^2 , $p=0,023$) (Figure 14).

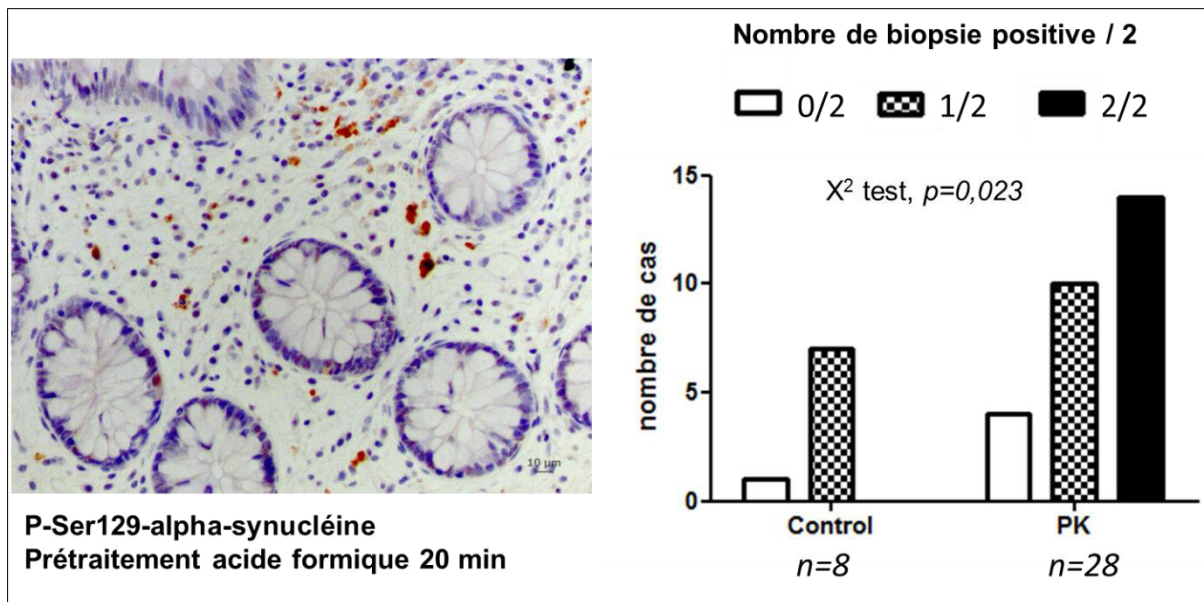


Figure 14. Illustration de l'IHC anti-P-Ser129-α-synucléine dans une coupe de biopsie coliques incluse en paraffine issu d'un patient parkinsonien et quantification du nombre de biopsies positives sur les 2 biopsies analysées de patients parkinsoniens (PK, n=28) et témoins (T, n=8))

Nous n'avons pas observé de corrélation entre le nombre de biopsies positives analysées par « whole-mount » et le nombre de biopsies sur analyse IHC de coupes incluses en paraffine.

Double immuno-marquage

Afin de déterminer la localisation cellulaire du marquage de P-Ser129- α -synucléine, nous avons réalisé un double marquage avec un anticorps anti-PGP9.5 marqueur neuronal et l'anti-P-Ser129- α -synucléine. Nous avons pu constater une absence de co-marquage, signifiant que le marquage observé n'est pas neuronal. A noter que le pattern du marquage de P-ser-129- α -synucléine est similaire à celui du marquage macrophagique CD68 (donnée non montrée), suggérant que l'immunomarquage P-ser-129- α -synucléine observé pourrait s'agir d'un marquage non spécifique des macrophages.

Discussion :

Cette étude montre que des coupes de biopsies coliques incluses en paraffine contiennent du tissu neuronal et sont donc potentiellement sources de dépôt pathologique d' α -synucléine. On observe la présence d'un immunomarquage de type P-Ser129- α -synucléine. Le nombre de biopsies positives vis-à-vis de ce marquage semble plus important chez les patients parkinsoniens que chez les témoins. Néanmoins, nous n'avons pas constaté de corrélation entre les patients ayant des biopsies positives pour le marquage P-Ser129- α -synucléine par IHC sur coupes incluses en paraffine et ceux l'ayant par IHC sur le tissu « whole-mount ». Ceci peut être expliqué par le fait que les biopsies analysées étaient différentes et qu'une synucléinopathie éparse peut passer inaperçue sur une biopsie espacée de quelques cm de l'autre. De plus, le tissu neuronal analysé n'est pas le même entre les deux techniques. Il s'agit du plexus sous muqueux pour l'étude en « whole-mount » après dissection de la sous muqueuse, alors qu'il s'agit essentiellement de fibres nerveuses inter-ganglionnaires de la muqueuse pour les coupes incluses en paraffine.

Néanmoins la prévalence élevée du marquage chez les témoins (7 des 8 patients et des biopsies analysées), son aspect granuleux cytoplasmique au sein de la muqueuse et l'absence de comarquage avec les structures neuronales nous font craindre qu'il s'agisse d'un marquage non

spécifique de l' α -syn, au sein des macrophages présents dans la muqueuse colique. Dans le SNE, l' α -synucléine entérique est physiologiquement exprimée dans les neurones mais aussi dans les cellules hématopoïétiques (les érythrocytes,(Nakai et al., 2007) les cellules sanguines circulantes mononuclées,(Kim et al., 2004) et les plaquettes (Li et al., 2002)), les cellules endothéliales et musculaires lisses,(Tamo et al., 2002) et dans les fibres musculaires (Askanas et al., 2000). Le marquage cytoplasmique observé pourrait alors également être le reflet de l' α -synucléine physiologique. Alors que dans le cerveau sain on estime que seuls 5 % de l' α -synucléine est phosphorylée sur la sérine 129 (Fujiwara et al., 2002), le degré de phosphorylation de l' α -synucléine dans le tube digestif n'est pas connu.

D'autres équipes se sont intéressées à la localisation de l'immunomarquage de l' α -synucléine dans le SNE. Elles ont utilisé les marqueurs neuronaux différents, voire des marqueurs de glie (S100) et surtout des méthodes d'immunohistochimie visant à détecter l' α -synucléine pathologique variées, rendant les comparaisons des études délicates.

En conclusion, cette étude rend compte des difficultés techniques de l'immunomarquage de l' α -synucléine et appelle à la prudence vis-à-vis de l'interprétation des résultats publiés concernant la détection de l' α -synucléine dans les biopsies coliques incluses en paraffine. Il était alors fortement nécessaire d'identifier une méthode optimale pour détecter l' α -synucléine pathologique au sein des biopsies du tissu digestif et d'harmoniser les études, tout comme l'a été la méthode IHC de détection de la synucléinopathie cérébrale (Alafuzoff et al., 2008; Beach et al., 2008b).

2.1.2 Evaluation des méthodes d'IHC visant à détecter la synucléinopathie de type Lewy dans les biopsies gastro-intestinales

Résumé des résultats publiés dans Acta Neuropathologica Communications

ARTICLE 2. Evaluation of α -synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies (Corbillé et al., 2016)

Corbillé AG, Letournel F, Kordower JH, Lee J, Shanes E, Neunlist M, Munoz DG, Derkinderen P, Beach TG.

La constatation que le tube digestif était le siège d'une synucléinopathie de type Lewy, lésions caractéristiques de la MP, chez presque tous les sujets atteints de MP a conduit un nombre croissant d'équipes à chercher à développer une procédure diagnostique de la maladie à partir de biopsies gastro-intestinales obtenues du vivant du patient par endoscopie.

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été menées sur la détection de la synucléinopathie présente dans le SNE, essentiellement par des méthodes IHC, dans le but de déterminer les valeurs diagnostiques de la STL vis-à-vis de la MP. Cependant, les études publiées concernant la sensibilité et la spécificité des biopsies gastro-intestinales pour la détection de la STL ont fourni des résultats contradictoires. Afin d'identifier une procédure optimale de détection de la STL dans les biopsies digestives, nous avons entrepris une étude collaborative multicentrique visant à comparer les performances diagnostiques de plusieurs méthodes d'IHC à partir d'un set commun de coupes de biopsies, avec une évaluation en aveugle. Quatre méthodes immunohistochimiques différentes, mises au point par quatre laboratoires spécialisés distincts, ont été évaluées pour leur sensibilité et leur spécificité pour détecter la STL entérique. Un ensemble test de sections de biopsies incluses en paraffines a été préparé à partir de biopsies coliques de neuf sujets parkinsoniens et de trois témoins et a été envoyé à chaque laboratoire participant pour immunomarquage selon leur méthode optimale. Toutes les coupes ont ensuite été analysées en aveugle par quatre observateurs différents. Quatre types de morphologie de marquage ont été observées, à des degrés variables selon les 4 méthodes

testées (marquage de type granulaire dans la lamina propria, de type vasculaire ou périvasculaire dans la sous-muqueuse, de type granulaire en dentelle dans la sous-muqueuse et marquage nucléaire des cellules épithéliales). Chaque type de marquage a été coté de façon semi-quantitative de 0 (absence de marquage) à 3 (marquage fréquent).

Un marquage positif pour l' α -synucléine a été observé par les 4 lecteurs dans la plupart des lames, quelle que soit la méthode utilisée, et y compris dans les coupes issues des sujets témoins. En outre, aucune des méthodes testées n'avait une spécificité et une sensibilité de plus de 80% vis-à-vis de la MP. Dans l'ensemble, notre étude suggère que les méthodes testées ne sont pas pertinentes pour la détection de la STL et la prédiction de la MP à partir des biopsies gastro-intestinales. D'autres études sont alors nécessaires pour tester de nouvelles méthodes d'immuno-coloration et évaluer la propension des biopsies gastro-intestinales à être source de biomarqueur de la MP.

RESEARCH

Open Access



Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies

Anne-Gaëlle Corbillé^{1,2,3,4,5}, Franck Letournel^{4,5}, Jeffrey H. Kordower⁶, John Lee⁷, Elisheva Shanes⁷, Michel Neunlist^{1,2}, David G. Munoz⁸, Pascal Derkinderen^{1,2,3,10*} and Thomas G. Beach⁹

Abstract

The observation showing that Lewy type synucleinopathy (LTS), the pathological hallmark of Parkinson's disease (PD), is found in the gut of almost all PD subjects led to a substantial amount of research to develop a diagnostic procedure in living patients based on endoscopically obtained gastrointestinal biopsies. However, the existing studies have provided conflicting results regarding the sensitivity and specificity of gastrointestinal biopsies for the detection of LTS. We therefore undertook a multi-center staining and blinded judging of a common set of slides from colonic biopsies to determine the optimal protocol for the detection of LTS. Four different immunohistochemical methods, developed in four separate expert laboratories, were evaluated for their sensitivity and specificity to detect enteric LTS. Test sets of formalin-fixed, paraffin-embedded sections from biopsies of 9 PD subjects and 3 controls were stained with the 4 methods and graded by 4 different observers. Four types of staining morphology (granular staining in the *lamina propria*, perivascular/vascular wall staining in the submucosa, lacy-granular pattern in the submucosa and epithelial cell nuclear staining) were variably observed in the slides stained by the 4 methods. Positive alpha-synuclein staining was observed by all 5 judges in most of the slides from control cases, regardless of the staining methods that were used. Moreover, none of the tested method or staining pattern had a specificity and sensitivity more than 80 % regarding to PD. Overall, our study suggest that the tested methods are not adequate for the prediction of PD using gastrointestinal biopsies. Future studies are warranted to test new immunostaining methods.

Keywords: Parkinson's disease, Gastrointestinal biopsies, Alpha-synuclein, Biomarker

Introduction

Since the discovery of aggregated and phosphorylated alpha-synuclein as the primary component of Lewy pathology, immunohistochemistry for alpha-synuclein has become the histological technique of choice for the diagnosis of Parkinson's disease (PD) [1, 2]. Several autopsy studies, showed that the distribution of Lewy-type synucleinopathy (LTS) is much greater than formerly appreciated extending to peripheral autonomic neuronal circuits [2, 3]. The presence of LTS in peripheral

neuronal tissues accessible to biopsies provides new opportunities for the development of original biomarkers that will directly assess the pathological process in living patients [4, 5]. Among these peripheral autonomic neuronal circuits, the enteric nervous system displays several specific features that make it a prime candidate tissue for being a histopathological marker of PD as (i) it is an integrative neuronal network whose organization and complexity closely resemble that of the central nervous system (ii) it has been shown to be affected by the pathological process in the vast majority of PD patients [3, 6–9] (iii) it is readily, repeatedly and safely accessible by endoscopic biopsies in living patients [10, 11]. This logically led laboratories to develop specific methods for

* Correspondence: derkinderenp@yahoo.fr

¹Inserm, U913, Nantes F-44035, France

²Nantes University, Nantes F-44035, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Corbillé et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

the detection of LTS in routine gastrointestinal biopsies. However, the diversity of methodology between studies, especially regarding the immunohistochemical methods used, has led to conflicting results and discrepancies regarding the sensitivity and specificity of gastrointestinal biopsies for the detection of LTS [12–17]. The aim of our research project was therefore to test several different immunohistochemical methods for the detection of LTS in colonic biopsy with the objective of identifying a highly sensitive and specific technique that might be widely and readily used in different laboratories. For this purpose, a panel of expert investigators have participated, based on their published work using alpha-synuclein immunohistochemistry [2, 13, 18, 19] and were asked to stain identical sets of paraffin-embedded sections from colonic biopsies with their own optimized method.

Materials and methods

Selection of subjects and formalin-fixed paraffin-embedded blocks

Nine PD patients were included in this study, chosen from among 29 subjects that had been recruited from the movement disorder clinic in Nantes University Hospital, France for a previously published study of enteric synucleinopathy in wholemount mucosal-submucosal biopsies [12]. From the same study, a set of 3 subjects (out of 10 in the original study) requiring a total colonoscopy for colorectal cancer screening were included as controls. The clinical characteristics of study subjects are summarized in Table 1.

The 3 control and 9 PD subjects were chosen after screening sections from their archived descending colon biopsies stored in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks. Screening was performed by AGC and FL of the Neuropathology Laboratory in Angers, France. Tissue blocks were fixed in 10 % (v/v) formalin for 48 h, embedded in paraffin and cut at 4 µm using a Leica RM125 microtome. Sections were collected on slides (Superfrost Plus, VWR, Fontenay sous Bois, France) and stained with an immunoperoxidase method for the detection of phosphorylated alpha-synuclein (Table 2). Global grading of all staining, regardless of morphology, was assigned using a 0–3 semi-quantitative density scale. PD cases were divided into 3 groups with 3 subjects in each group, one group with sparse staining density (PD

group 0), one with moderate staining density (PD group 1) and one with high staining density (PD group 2). Control subjects had minimal staining densities (Table 1).

None of the control subjects had a history of neurological or psychiatric diseases, none had abnormalities on neurological examination and on telephone interviews done in 2014 none had subsequently developed parkinsonian signs or symptoms. The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest VT*), and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Preparation of test slides and distribution to participating labs

The design of the study is depicted diagrammatically in Fig. 1. Four unstained sections (4 µm) from each block (each block containing one biopsy tissue fragment) were sent by the central laboratory (AGC and PD) along with a brief methods section describing how the tissue was sampled to the 3 other participating testing laboratories (48 slides per lab, 144 slides in all). Each participating lab (TB, DM and JK) including the central laboratory stained the full set of sections with their optimal immunoperoxidase method for enteric synucleinopathy (Table 2). Blocks were assigned a number from 1–12 using a random number generator in order to blind evaluators to diagnosis.

Slides grading and statistical analysis

The stained slide sets were initially examined by TB, who then constructed four different semi-quantitative grading templates (Fig. 2 and Additional file 1: Figures S1 and S2) with associated scoring tables for each of the four major morphological staining types present. The four different staining patterns were: (1) granular staining in the *lamina propria* of the mucosa (2) perivascular/vascular wall staining with a fine dotted pattern, in the submucosa (3) lacy-granular pattern in the submucosa (4) epithelial cell nuclear staining. The photomicrographs in Fig. 2 illustrate each staining pattern. As some of the staining patterns (types 2 and 3) were present only in the submucosa, or depended on the presence of blood vessels in the submucosa, the

Table 1 Clinical and pathological characteristics of study subjects

Diagnosis	Age Mean (range)	Gender M:F	Disease duration (y) mean (range)	Wholemount synucleinopathy density grade mean (range)	FFPE synucleinopathy density grade mean (range)
Control (n = 3)	64 (61–68)	2:1	N/A	0	0
PD (n = 9)	66 (47–71)	8:1	12.2 (4–20)	1.6 (0–2)	1.9 (0.5–3)

Presumptive synucleinopathy in the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) sections was graded on a 0–3 scale. Wholemount synucleinopathy scores shown are from the original published study [12] and were graded as 0–2 based on the number of positive biopsies out of the 4 that were taken from each subject (the maximum assigned score was 2)

Table 2 Immunoperoxidase methods used by the central laboratory (AGC/FL) and the three testing laboratories

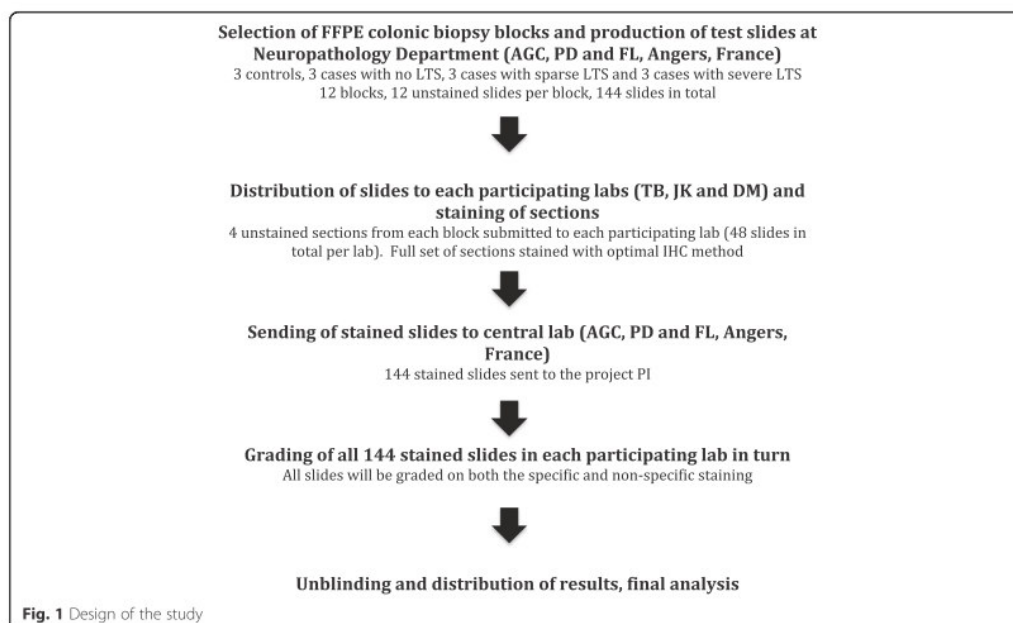
	Primary antibody	Epitope exposure	Signal development
AGC/FL (Angers, France)	p-synuclein, #64 WAKO, Osaka 1:30,000	Formic acid (80 %) 20 min	BOND MAX Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, U.K.
TB (Sun City, AZ)	p-synuclein, polyclonal H. Akiyama, Tokyo 1:10,000	Proteinase K 1:100 37 ° C, 20 min	ABC, DAB Vector Laboratories
JK (Chicago, IL)	Alpha-synuclein, LB509 Invitrogen 1:500	Formic acid (88 %) 20 min	ABC, DAB Vector Laboratories
DM (Toronto, Canada)	p-synuclein, #64 WAKO, Osaka 1:12,000	Ventana Protease 2 72 ° C, 8 min Citrate buffer, pH 6.4 90 ° C, 4 min	Ventana Benchmark Ultra, Optiview multimer and amplifier

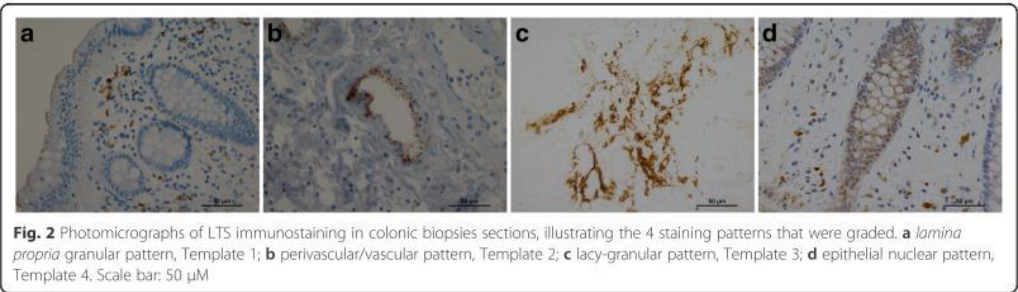
p-synuclein = alpha-synuclein phosphorylated at serine 129; ABC = avidin-biotin peroxidase complex; DAB = 3, 3'-di-aminobenzidine

presence or absence of submucosa or blood vessels was recorded for each biopsy. No assumptions were made as to whether any of the staining patterns seen might represent specific or non-specific staining of pathological alpha-synuclein deposits, and all slides were graded for each pattern by each participating test lab in turn (TB, JK, and DM) and one additional judge: John Lee, MD, PhD, of the Department of Pathology, NorthShore University Health System, Evanston, IL). The slides as well as the scoring tables were then returned to PD at the central laboratory. Density scores of none, sparse, moderate and frequent were converted to numerical

values (0–4) for statistical analysis. Sum and average score per biopsy were calculated. All labs submitted their grading to the project principal investigator and results were analyzed after unblinding.

Statistical analyses were performed using intraclass correlation coefficient for judge ratings of staining densities, for each laboratory (TB, JK, FL, DM) and staining template pattern (LP = *lamina propria* granular pattern; EC = endothelial cell nuclear pattern; LG = lacy-granular pattern; PV = perivascular-vascular pattern) were determined. The diagnostic accuracy of each staining pattern, in terms of being able to predict a diagnosis





of PD, was calculated from each individual judge's results and for the average of all judge's results, for all applicable staining patterns seen on slides from each testing laboratory as well as from the central laboratory.

Results

LTS staining pattern and density scores

The density scores of the 4 raters were averaged to obtain a mean score of LTS staining per biopsy. Figure 3 represents the mean of density score by groups (controls and PD groups) for each staining pattern. Additional file 1: Table S1 shows the results of individual judge scores for the staining done by each test laboratory as well as by the central laboratory, for each scoring template. The four types of staining morphology were variably present in the slides stained by the 4 methods. The granular lamina propria staining was seen to some extent in all slide sets. The perivascular-vascular pattern was seen in slides stained by two of the labs (DM, AGC/FL). The submucosa lacy-granular pattern was seen only in slides stained by one lab (JK). The epithelial cell

nuclear staining pattern was seen in slides stained by two labs (TB, AGC/FL).

Interobserver reliability and intraclass correlation coefficient

Interobserver reliability was generally moderately acceptable except for some staining morphology types in two laboratories (TB and AGC/FL, Table 3). Judge's results were excluded when submucosa was not present, for those staining morphologies dependent on the presence of submucosa (DM-PV, JK, AGC/FL-PV). Submucosa was not present in 6 out of 48 slides.

Intraclass correlation coefficient for judge ratings of staining densities, for each laboratory and staining morphology type is shown in Table 3. Some judges did not rate some staining patterns for some laboratories. Results are therefore given for four judges where all judge scores were available and for the three common judges when one or more judge scores were missing. Cases without submucosa in the slide were excluded from results for staining morphologies

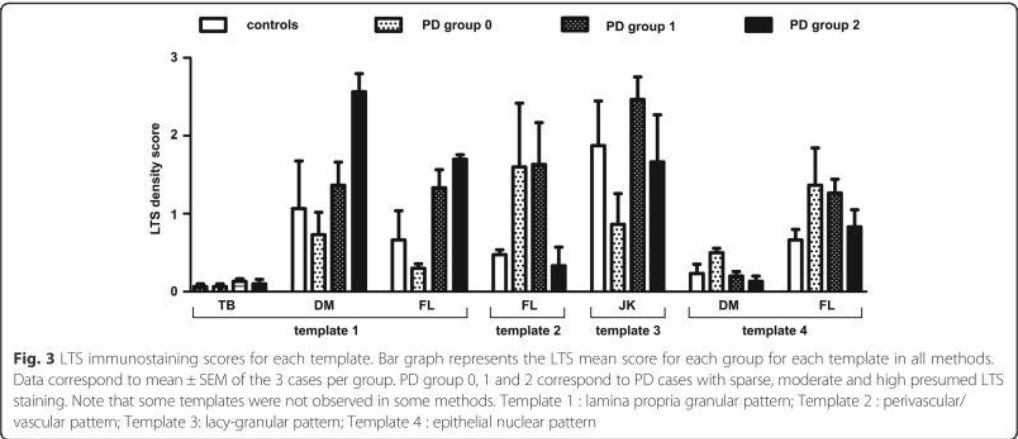


Table 3 Intraclass correlation coefficient (ICC) for judge ratings of staining densities, for each testing laboratory (DM, TB, JK) and the central laboratory (AGC/FL), of each staining morphology type (LP = lamina propria granular pattern; EC = epithelial cell nuclear pattern; LG = lacy-granular pattern; PV = perivascular-vascular pattern)

	Box 1 DM-LP	Box 2 TB-EC	Box 2 TB-LP	Box 3 JK-LG	Box 3 JK-LG ^a	Box 4 AGC/FL-EC	Box 4 AGC/FL-LP	Box 4 AGC/FL-PV
<i>n</i>	12	12	12	12	11	12	12	12
Four Raters								
ICC	0.73	-0.04	0.02	0.81	0.78	NA	0.53	NA
Three Raters								
ICC	0.88	-0.05	0.00	0.79	0.72	0.16	0.78	0.80

Some judges did not rate some staining patterns for some laboratories; results are therefore given for four judges where all judge scores were available and for the three common judges when one or more judge scores were missing. Cases without submucosa in the slide were excluded from results for staining morphologies dependent on the presence of submucosa (Box 3, JK-LG)

^aExcluding insufficient submucosa

dependent on the presence of submucosa (DM-PV, AGC/FL-PV, JK-LG).

Diagnostic accuracy for identifying PD cases, of judge ratings of staining densities, for each laboratory and staining morphology type were calculated (Table 4). Cases without submucosa in the slide were excluded from results for staining morphologies. Sensitivity were often acceptable (>80 %) but specificity too weak. None of the tested method or staining pattern had a specificity and sensitivity more than 80 % regarding to PD.

Discussion

The primary aim of this study was to evaluate and compare different IHC methods for the detection of LTS in colonic biopsies. Regarding the ability to discriminate between control and PD subjects, the overall impression is that this was not accomplished by any of the staining methods or morphologically-defined staining types.

One of the striking results of our study is that positive alpha-synuclein staining was observed by all 4 judges in most of the slides from control cases, regardless of the

Table 4 Diagnostic accuracy for identifying PD cases, of judge ratings of staining densities, for each laboratory (DM, TB, JK, AGC/FL) and staining morphology type (LP = lamina propria granular pattern; EC = endothelial cell nuclear pattern; LG = lacy-granular pattern; PV = perivascular-vascular pattern). Results for the average of judge's ratings as well as the "best" judge's ratings are shown. Some judges did not rate some staining patterns for some laboratories; results are therefore given for four judges where all judge scores were available and for the three common judges when one or more judge scores were missing. Cases without submucosa in the slide were excluded from results for staining morphologies dependent on the presence of submucosa (DM-PV, AGC/FL-PV, JK-LG). AUC = area under curve

	Box 1 DM-LP	Box 1 DM-LP ^a	Box 2 TB-EC	Box 2 TB-LP	Box 3 JK-LG	Box 3 JK-LG ^a	Box 4 AGC/FL-EC	Box 4 AGC/FL-LP	Box 4 AGC/FL-LG
<i>N</i>	12	7	12	12	12	11	12	12	12
Four Raters									
AUC	0.63	0.65	NA	NA	0.58	0.53	NA	0.67	NA
Sensitivity	86 %	83 %	28 %	28 %	89 %	97 %	NA	81 %	NA
Specificity	25 %	0 %	75 %	83 %	17 %	17 %	NA	33 %	NA
Youden Index	0.11	-0.17	0.03	0.11	0.06	0.14	NA	0.14	NA
Three Raters									
AUC	0.62	0.53	NA	NA	0.58	0.51	0.71	0.67	0.69
Sensitivity	85 %	78 %	37 %	15 %	89 %	100 %	74 %	74 %	70 %
Specificity	33 %	0 %	67 %	100 %	11 %	11 %	56 %	22 %	44 %
Youden Index	0.19	-0.22	0.04	0.15	0.00	0.11	0.30	-0.04	0.15
Best Rater									
Rater	DM	JK	JL	JL	JK	DM	JL	JK	DM
AUC	0.61	1.00	0.50	0.72	0.59	0.46	0.83	0.67	0.80
Sensitivity	100 %	100 %	78 %	44 %	89 %	100 %	67 %	100 %	78 %
Specificity	33 %	0 %	33 %	100 %	33 %	33 %	100 %	67 %	67 %
Youden Index	0.33	0.00	0.11	0.44	0.22	0.33	0.67	0.67	0.44

^aExcluding insufficient submucosa

staining methods that were used. Although several studies showed a high sensitivity of FFPE gastrointestinal biopsies for the detection of LTS in PD patients [13, 15], recent reports have raised concerns regarding the specificity of this approach because alpha-synuclein immunoreactivity was also observed in some healthy individuals without PD [17, 20]. This lack of specificity may result from technical difficulties inherent in the use of FFPE gastrointestinal biopsies for the detection of alpha-synuclein. Besides neurons, alpha-synuclein is physiologically expressed by red blood cells and vascular endothelial cells [21, 22], two cell types, which can be retrieved from a routine gastrointestinal biopsy and thus be detected by alpha-synuclein immunohistochemistry in both healthy subjects and PD patients. Moreover, the interpretation of alpha-synuclein immunostaining for the detection of enteric LTS in PD can be delicate because of the scarcity and the morphology of the lesions. Rare typical Lewy bodies have been reported in the outermost plexus of the gut, namely the myenteric plexus, which can not be reached with a routine gastrointestinal biopsy [8, 17, 20]. By contrast, the mucosa and the submucosa, which are captured by the biopsy-forceps, primarily contain thread-like and dot-like alpha-synuclein deposits in nerve endings, reminiscent of the small-sized Lewy neurites observed in the brain [8, 12, 23, 24]. Such a morphology of staining can make it difficult to differentiate between LTS and physiological and/or non-specific alpha-synuclein staining in endoscopic tissue samples.

The above-mentioned limitations outline the critical need to develop proper neuronal counterstaining for the analysis of LTS in gastrointestinal biopsies. Combining routine colonic biopsies and microdissection techniques, we have previously shown that collecting whole-mounts of submucosa and mucosa enable a comprehensive assessment of the neural networks of these two structures [11, 12]. In such whole mount-preparations, immunohistochemical analysis with a general neuronal marker such as PGP9.5, NF220 and Hu revealed that a single standard colonic biopsy contains an average of 150 submucosal neurons and a dense network of nerve fibers in the mucosa [11, 24]. Although this approach provides outstanding information on the morphology of enteric neurons and allows the detection of Lewy pathology in most PD subjects, it nonetheless has several limitations as it has to be performed quickly following the endoscopic procedure, requires an experienced technician and is not suitable for retrospective analysis. It is therefore unlikely that such a procedure will be used in large-scale multicenter studies and there is a clearly need for reliable ways to label neuronal structures in FFPE gastrointestinal biopsies. Most of the available studies performed on FFPE blocks did not use any neuronal markers and relied primarily on morphology to identify the neuronal processes [13, 16, 17]. Only

two studies used S100 staining to exclude a significant proportion of biopsies from analysis due to the lack or paucity of nerve fibers [14, 15]. For specificity reason, we would however not recommend the use of S100 staining for the detection of the neuronal processes as this protein is widely expressed by enteric glial cells, which are found in routine gastrointestinal biopsies [25]. Our preliminary observation suggests that immunostaining with the pan neuronal marker PGP9.5 is an efficient screening method to establish whether the tissue sample contains an adequate number of neuronal structures.

In the current study, 3 out of 4 participating laboratories used antibodies against alpha-synuclein phosphorylated at serine 129 to detect LTS. Since the discovery by Fujiwara and coworkers that this residue was selectively and extensively phosphorylated in synucleinopathy lesions [26], antibodies for phosphorylated alpha-synuclein have been widely used to label LTS in the central nervous system as well as in peripheral autonomic networks including the enteric nervous system [3, 9]. Regarding gastrointestinal biopsies, most of the existing studies have used phospho-alpha-synuclein rather than total alpha-synuclein antibodies for the detection of pathological alpha-synuclein. Although some studies reported that staining with phospho-alpha-synuclein antibodies to be more extensive to that obtained with total alpha-synuclein [14, 27], other studies found the opposite [15, 16]. This may be due to the fact that a small amount (around 4 %) of alpha-synuclein is physiologically phosphorylated at serine 129 [26], implying that phospho-synuclein antibodies can detect physiologic non-aggregated protein when no pretreatment is used. In this context, Visanji et al. recently adapted the paraffin-embedded tissue (PET) blot method, which degrades physiologic nonaggregated proteins and has been demonstrated to have superior sensitivity in detecting aggregated protein, to the detection of LTS in gastrointestinal samples [16]. Surprisingly, they observed phospho-alpha-synuclein immunostaining in the colonic mucosa of 11/11 of control subject, despite the use of the PET blot method. This strongly suggests that non specific staining occurs in the gastrointestinal mucosa when phospho-alpha-synuclein antibodies are used, thereby explaining the lack of specificity observed in our study.

One obvious limitation of our study is the small sample size of the control group and it is possible that if it was repeated with more controls, the diagnostic accuracy of some of the methods might be higher. Another limitation was the absence of submucosa, blood vessels or judge's scores for most of the slides, and for two of three control cases, rated for the perivascular staining morphology produced by the one testing laboratory (DM). It is possible, if all three controls had been graded and the staining scores segregated with the appropriate

diagnosis, that the results for this laboratory may have been in fact acceptably accurate. Arguing against this possibility, however, is the low accuracy for this same morphology as produced by the central laboratory.

Conclusions

In conclusion, although our study has produced results that are less than definitive but it suggests that the tested immunohistochemical methods are not adequate for the prediction of PD in endoscopically obtained gastrointestinal biopsies. This failure may be due to the relative rarity of neuronal synucleinopathy in the submucosa of the colon or to the lack of sensitivity and specificity of the methods tested. Future studies including more control subjects along with new staining methods and screening for neuronal markers are needed.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Templates used for semi-quantitative grading of staining morphologies present in the test sections. **Figure S2.** Representative Hematoxylin and Eosin staining of a colonic biopsy defining the regions available for assessment (mucosa and submucosa). Scale bar 200 μ m. **Table S1.** Results of individual judge scores for the staining done by each test laboratory as well as by the central laboratory, for each scoring template. (PDF 3317 kb)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

AGC, JK, DM, PD and TB designed the study. AGC, FL, MN and PD selected the test slides and supervised the slides distribution. AGC, FL, JK, DM and TB stained and graded the slides. JL and ES graded the slides. PD and TB wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Michael J Fox foundation for Parkinson's research to PD and TB. AGC is a recipient of a *poste d'accueil Inserm*.

Author details

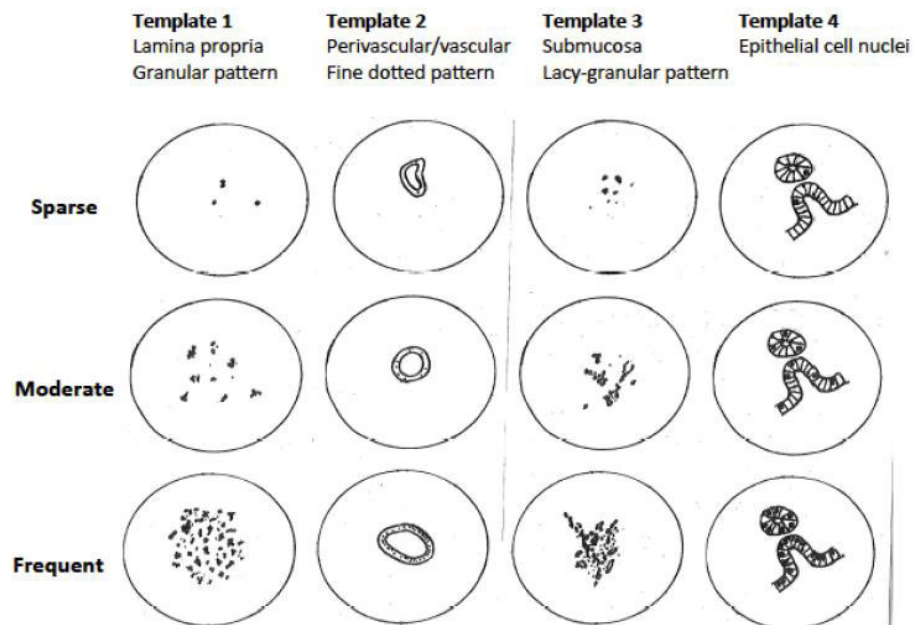
¹Inserm, U913, Nantes F-44035, France. ²Nantes University, Nantes F-44035, France. ³Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes F-44093, France. ⁴CHU Angers, Neurobiology and Neuropathology Laboratory, Angers F-49033, France. ⁵Université d'Angers, UPRES EA3143, Angers F-49033, France. ⁶Department of Center for Brain Repair, Department of Pathology, Rush Medical College, Chicago, IL, USA. ⁷Department of Pathology, NorthShore Medical Group, Evanston, IL 60201, USA. ⁸Laboratory Medicine, St. Michael's Hospital, University of Toronto & Li Ka Shing Knowledge Institute, Toronto, ON, Canada. ⁹Banner Sun Health Research Institute, Sun City, AZ, USA. ¹⁰Department of Neurology, CHU Nantes, 44093 Nantes, France.

Received: 22 February 2016 Accepted: 19 March 2016

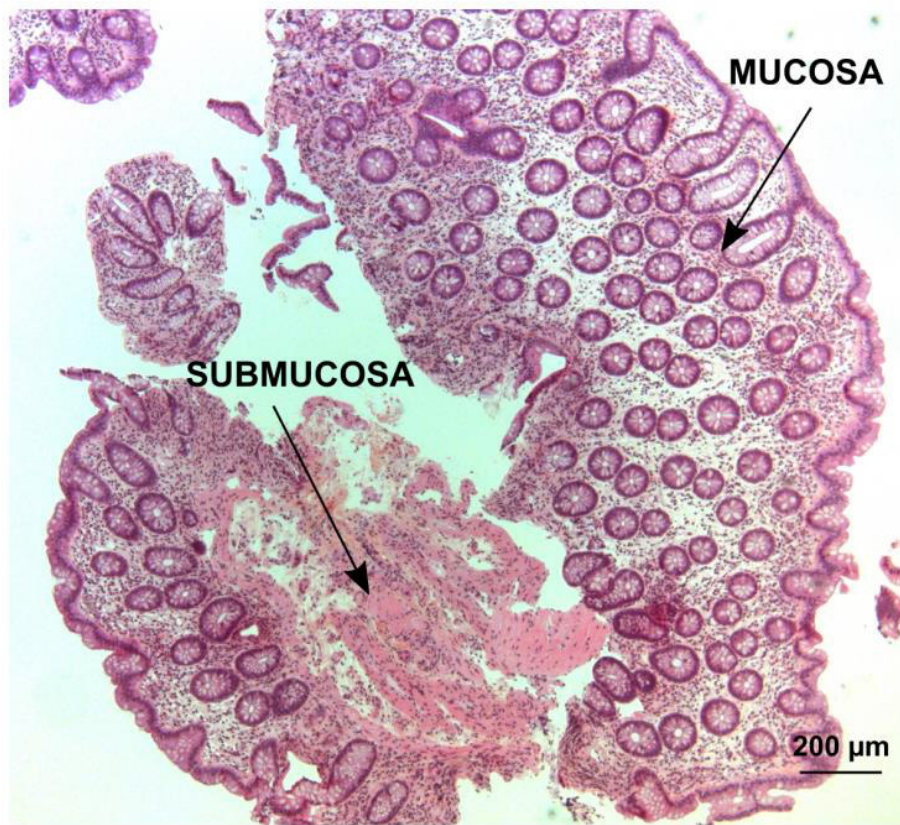
Published online: 04 April 2016

References

- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839–40.
- Beach TG, White CL, Hamilton RL, et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol*. 2008;116:277–88.
- Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord*. 2014;29:410–5.
- Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, et al. Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front Psychiatry*. 2010;1:128.
- Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A, et al. Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol*. 2016;23:247–61.
- Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology*. 1984;87:848–56.
- Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, et al. Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology*. 1987;37:1253–5.
- Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, et al. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol*. 1988;76:217–21.
- Beach TG, Adler CH, Sue LJ, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2009;119:689–702.
- Atkin WS, Cook CF, Cuzick J, et al. Single flexible sigmoidoscopy screening to prevent colorectal cancer: baseline findings of a UK multicentre randomised trial. *Lancet*. 2002;359:1291–300.
- Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22:e11–4.
- Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*. 2010;5:e12728.
- Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012;27:709–15.
- Hilton D, Stephens M, Kirk L, et al. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2014;127:235–41.
- Sánchez-Ferro A, Rábano A, Catalán MJ, et al. In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30:517–24.
- Visanji NP, Marras C, Kern DS, et al. Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology*. 2015;84:609–16.
- Chung SJ, Kim J, Lee HJ, et al. Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord*. 2016;31:241–9.
- Gold A, Turkalt ZT, Munoz DG. Enteric alpha-synuclein expression is increased in Parkinson's disease but not Alzheimer's disease. *Mov Disord*. 2013;28:237–40.
- Folgoas E, Lebouvier T, Leclair-Visonneau L, et al. Diagnostic value of minor salivary glands biopsy for the detection of Lewy pathology. *Neurosci Lett*. 2013;551:62–4.
- Visanji NP, Marras C, Hazrati L-N, et al. Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov Disord*. 2014;29:444–50.
- Tamo W, Imaizumi T, Tanji K, et al. Expression of alpha-synuclein, the precursor of non-amyloid beta component of Alzheimer's disease amyloid, in human cerebral blood vessels. *Neurosci Lett*. 2002;326:5–8.
- Nakai M, Fujita M, Waragai M, et al. Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358:104–10.
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. 2006;396:67–72.
- Poulet H, Lebouvier T, Coron E, et al. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24:e202–5.
- Ferri GL, Probert L, Cocchia D, et al. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*. 1982;297:409–10.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 2002;4:160–4.
- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, et al. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut*. 2008;57:1741–3.



Supplementary Figure 1. Templates used for semi-quantitative grading of staining morphologies present in the test sections.



Supplementary Figure 2. Representative Hematoxylin and Eosin staining of a colonic biopsy defining the regions available for assessment (mucosa and submucosa). Scale bar 200 μM.

TEMPLATE 1			
	TB	DM	AGC
Control 1	0,1	0,1	0,2
Control 2	0,1	2,2	1,4
Control 3	0,0	0,9	0,4
controls (mean)	0,1	1,0	0,7
PD 1	0,1	0,4	0,3
PD 2	0,1	1,3	0,4
PD 3	0,0	0,5	0,2
PD group 0 (mean)	0,0	0,7	0,3
PD 4	0,1	1,8	1,4
PD 5	0,2	0,8	0,9
PD 6	0,1	1,5	1,7
PD group 1 (mean)	0,1	1,3	1,3
PD 7	0,2	2,8	1,7
PD 8	0,1	2,1	1,8
PD 9	0,0	2,8	1,6
PD group 2 (mean)	0,1	2,6	1,7

TEMPLATE 2	
	AGC
Control 1	0,5
Control 2	0,6
Control 3	0,3
controls (mean)	0,5
PD 1	0,0
PD 2	2,7
PD 3	2,1
PD group 0 (mean)	1,6
PD 4	1,9
PD 5	2,4
PD 6	0,6
PD group 1 (mean)	1,6
PD 7	0,0
PD 8	0,8
PD 9	0,2
PD group 2 (mean)	0,3

TEMPLATE 3	
	JK
Control 1	0,3
Control 2	3,0
Control 3	2,3
controls (mean)	1,9
PD 1	0,1
PD 2	1,4
PD 3	1,1
PD group 0 (mean)	0,9
PD 4	3,0
PD 5	2,0
PD 6	2,4
PD group 1 (mean)	2,5
PD 7	0,5
PD 8	2,0
PD 9	2,5
PD group 2 (mean)	1,7

TEMPLATE 4		
	DM	AGC
Control 1	0,0	0,4
Control 2	0,4	0,8
Control 3	0,3	0,8
controls (mean)	0,2	0,7
PD 1	0,5	2,3
PD 2	0,6	0,7
PD 3	0,4	1,1
PD group 0 (mean)	0,5	1,3
PD 4	0,1	1,2
PD 5	0,3	1,0
PD 6	0,2	1,6
PD group 1 (mean)	0,2	1,3
PD 7	0,0	0,4
PD 8	0,2	1,1
PD 9	0,2	1,0
PD group 2 (mean)	0,1	0,8

Supplementary Table 1. Results of individual judge scores for the staining done by each test laboratory as well as by the central laboratory, for each scoring template.

2.1.3 Evaluation des méthodes d'IHC visant à détecter la synucléinopathie de type Lewy dans les échantillons coliques issues d'autopsie (de patients parkinsoniens et de témoins)

Résumé des résultats publiés dans Journal of Parkinson Disease

ARTICLE 3. Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological A-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects (Beach et al., 2016)

Beach TG, Corbillé AG, Letournel F, Kordower JH, Kremer T, Munoz DG, Intorcia A, Hentz J, Adler CH, Sue LI, Walker J, Serrano G, Derkinderen P.

Cette publication est issue de la suite du travail collaboratif multicentrique dont l'objectif global est de développer un outil diagnostique de la MP à partir de tissu gastro-intestinal.

La divergence des résultats obtenus lors des études publiées concernant la présence de STL dans les biopsies coliques de sujets atteints de la maladie de Parkinson (PD) nous a conduit à réaliser une évaluation multicentrique en deux parties. La première partie, détaillée dans la publication précédente (Corbillé et al., 2016), a examiné les méthodes de détection de la STL dans des biopsies coliques archivées et a constaté qu'aucune des méthodes testées n'était suffisamment sensible ou spécifique vis-à-vis de la MP.

Etant donné que la quantité de tissu nerveux contenue dans les biopsies coliques est relativement faible et peut être insuffisante pour détecter la STL et que le diagnostic de certitude de la MP repose sur l'examen anatomopathologique du cerveau, nous avons utilisé pour la suite du projet des sections comprenant la totalité de l'épaisseur du côlon sigmoïde issues d'autopsie de patient ayant le diagnostic de MP prouvé et de sujets témoins.

Pour cette étude, sept méthodes d'IHC différentes ont été utilisées, employant cinq anticorps primaires différents et quatre combinaisons différentes de protocoles de démasquage des épitopes et de développement du signal. Le marquage de la STL a été défini comme spécifique lorsqu'il avait des caractéristiques morphologiques compatibles avec des éléments neuronaux.

Les lames de chaque sujet ont été indépendamment cotées par quatre évaluateurs, en aveugle du diagnostic, comme étant positive ou négative pour la STL, et la densité de la STL classée selon un score semi-quantitatif.

Les performances diagnostiques moyennes des méthodes IHC et leur concordance ont été nettement variables selon les évaluateurs. En prenant en compte les deux évaluateurs les plus précis, cinq méthodes diagnostiques sur les sept testées ont révélé des performances diagnostiques satisfaisantes avec une exactitude de 70% ou plus. Une méthode avait 100% de précision diagnostique et une concordance inter lecteur de 100%. La prévalence de la STL était la plus importante dans la sous muqueuse, suivie de la musculuse et de la muqueuse. D'après un marquage neuronal, le marquage de la STL est conforme à la morphologie des neurones, suggérant qu'il s'agit bien de dépôt d' α -synucléine neuronale.

La principale conclusion de cette étude est que, lorsque la sous-muqueuse est en quantité suffisante, la STL est présente dans le SNE de prélèvements coliques. De plus, avec des lecteurs formés à une grille de cotation, la présence de STL contenue dans le colon semble permettre de discriminer de façon fiable les sujets parkinsoniens des témoins, et ce pour différentes IHC utilisées.

Des études appliquant ces méthodes à un nombre plus important de patients sont alors nécessaires pour estimer les performances diagnostiques de la STL entérique dans la population générale vis-à-vis de la MP et des autres synucléinopathie cérébrales.

Research Report

Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological Alpha-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects

Thomas G. Beach^{a,*}, Anne-Gaëlle Corbillé^{b,c,d,e,f}, Franck Letournel^{e,f}, Jeffrey H. Kordower^g, Thomas Kremer^h, David G. Munozⁱ, Anthony Intorcchia^a, Joseph Hentz^j, Charles H. Adler^j, Lucia I. Sue^a, Jessica Walker^a, Geidy Serrano^a and Pascal Derkinderen^{b,c,d}

^aBanner Sun Health Research Institute, Sun City, AZ, USA

^bInserm, U913, Nantes, France

^cNantes University, Nantes, France

^dDepartment of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

^eCHU Angers, Neurobiology and Neuropathology Laboratory, Angers, France

^fUniversité of Angers, UPRES EA3143, Angers, France

^gCenter for Brain Repair, Department of Pathology, Rush Medical College, Chicago, IL, USA

^hRoche Pharmaceutical Research and Early Development, Nord DTA, Biomarker and Clinical Imaging, Roche Innovation Center, F Hoffman-La Roche, Ltd., Basel

ⁱLaboratory Medicine, St. Michael's Hospital, University of Toronto & Li Ka Shing Knowledge Institute, Toronto, ON, Canada

^jMayo Clinic Arizona, Scottsdale, Arizona

Accepted 3 August 2016

Abstract.

Background: Conflicting results from studies of Lewy-type α -synucleinopathy (LTS) in colonic biopsies of subjects with Parkinson's disease (PD) prompted a two-part multicenter assessment. The first assessment, now published (Acta Neuropathol Commun 4 : 35, 2016), examined archived colonic biopsies and found that none of the tested methods was adequately sensitive or specific.

Objective: As the amount of nervous tissue in typical colonic biopsies may be insufficient, and the clinical diagnosis of PD not completely accurate, the objective of the current study was to use instead full-thickness sections of sigmoid colon from autopsy-proven PD and normal subjects.

Methods: Seven different immunohistochemical (IHC) methods were used, employing five different primary antibodies and four different combinations of epitope exposure and signal development protocols. Specific staining was defined as being restricted to morphological features consistent with neuronal elements. Stained slides from each subject were independently

*Correspondence to: Thomas G. Beach, MD, PhD, Banner Sun Health Research Institute, 10515 West Santa Fe Drive, Sun City, AZ 85351, USA. E-mail: thomas.beach@bannerhealth.com.

categorized as being positive or negative for LTS, and their density semi-quantitatively graded, by four raters blinded to diagnosis.

Results: Agreement and mean diagnostic performance varied markedly between raters. With the two most accurate raters, 5 methods achieved diagnostic accuracies of 70% or greater; one method had 100% accuracy and 100% inter-rater agreement. The submucosa had the highest prevalence of pathological LTS staining, followed by the muscularis and mucosa.

Conclusions: The major conclusion of this study is that, when sufficient submucosa and LTS is present, and when specific staining is defined as being consistent with neuronal morphology, adequately-trained raters may reliably distinguish PD colon from control using suitable IHC methods.

Keywords: Lewy body, gastrointestinal tract, diagnosis, pathology, biopsy, enteric nervous system

INTRODUCTION

By 2012, a series of observations by multiple groups [1–11] had indicated that Lewy-type α -synucleinopathy (LTS) may be present in the colon of many subjects with prodromal and clinically-manifest Parkinson's disease (PD) and other Lewy body disorders (LBD), raising the potential for an endoscopically-obtained molecular diagnosis. However, a number of subsequently-published studies [12–26] have had conflicting results regarding the sensitivity and specificity of colonic biopsies for the detection of LTS. Under the sponsorship of the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (MJFF), two studies were directed at comparing the ability of several immunohistochemical (IHC) methods to accurately differentiate Parkinson's disease (PD) subjects from normal controls on the basis of colonic LTS.

The first study, now published [27], examined LTS in archived colonic biopsies. The conclusion of this study was that adequate diagnostic accuracy was not achieved by any of the staining methods or morphologically-defined staining types. Positive staining, in densities similar to those seen in PD cases, was seen in most of the slides from control cases, with most of the staining methods used, by most of the raters. Limitations of this prior study included the lack of neuropathological confirmation of the diagnosis of PD, the absence and/or relatively small amounts of submucosa in many of the slides and the probable scarcity of neuronal elements in the typically small colonic biopsy samples.

The objective of this second study, therefore, was to evaluate several IHC methods in large, full-thickness sigmoid colon sections from autopsied PD and control subjects. There were at least two reasons for using colon autopsy specimens in this second study, rather than biopsy specimens: 1) the unequivocal presence or absence of PD in each autopsied subject had been established through clinical evaluation and a full neu-

ropathological examination, whereas subjects with archived biopsies are generally still alive or, if they have died, often have not had neuropathological confirmation of PD. The diagnostic error rate of a clinical diagnosis of PD ranges from 15 to 50%, depending on disease duration [28] 2) autopsy specimens are much larger than biopsy specimens, and include abundant submucosa as well as the muscularis layer with their respective neuronal plexuses, so there will be a greater probability that the specimen will contain adequate densities of neuronal structures. The plexus within the muscularis layer has been reported to have, within the colon, the greatest density of LTS [3, 5, 10, 11]. The biopsy study may have failed due to sparse or absent neuronal structures in the much smaller samples.

MATERIALS AND METHODS

Consecutive or near-consecutive sections of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) autopsy-derived sigmoid colon, from 5 PD and 5 control subjects, were provided by the Banner Sun Health Research Institute Brain and Body Donation Program (BBDP; www.brainandbodydonationprogram.org) [29]. The operations of the BBDP have been approved by the Western Institutional Review Board. Subjects (Table 1) were chosen on the basis of the absence of clinical or incidental colonic pathology as well as clinicopathological confirmation of PD and both clinical (absence of dementia or parkinsonism) and pathological control status (absence of LTS in the brain and/or previously-sampled peripheral nervous system). As the sigmoid colon had not previously been tested for the presence of LTS in most of these subjects, the PD subjects were chosen from amongst those with documented higher density scores in the submandibular gland and esophagus (two of the peripheral sites routinely tested for LTS by the BBDP), on the assumption that these subjects would also be likely to have higher LTS density

Table 1

Characteristics of study subjects. PMI = postmortem interval in hours; clinical symptoms = symptom duration in years; UPDRS = last motor score prior to death on the Unified Parkinson's Disease Rating Scale; Unified Lewy Stage = brain stage of LTS according to the Unified Staging System for Lewy Body Disorders [30]; Lewy CNS Load = mean summary score of LTS density in 10 standard brain regions; Lewy PNS Load = mean summary score of LTS density in lower esophagus and submandibular gland

	Age Mean (SD)	Gender (M : F)	PMI Mean (SD)	Clinical Symptoms, Years Mean (SD)	UPDRS ¹ Mean (SD)	Unified Lewy Stage Median	Lewy CNS Load Mean (SD)	Lewy PNS Load Mean (SD)
PD (n = 5)	77.4 (6.9)	5 : 0	3.1 (0.9)	15.2 (8.0)	36.8 (16.9)	IV. Neocortical	30.6 (2.5)	5.5 (1.1)
Control (n = 5)	81 (7.5)	5 : 0	3.3 (1.3)	NA	13.7 (10.1)	0. No Lewy Bodies	0 (0)	0 (0)

¹Four PD cases were on medication while one was off; 2 control subjects did not have UPDRS score available.

Table 2

Immunohistochemical methods used by the four participating laboratories. p-synuclein = α -synuclein phosphorylated at serine 129; a-synuclein = α -synuclein unmodified form; ABC = avidin-biotin peroxidase complex; DAB = 3, 3' di-aminobenzidine

	Primary antibody	Epitope exposure	Signal development
Method 1	p-synuclein, monoclonal P-syn/81 ^a Biolegend [31] 1 : 50,000	Ventana Protease 2 72° C, 8 minutes Citrate buffer, pH 6.4 90° C, 4 minutes	Ventana Benchmark Ultra, Optiview multimer and amplifier
Method 2	p-synuclein, polyclonal H. Akiyama, Tokyo [32–35] 1 : 10,000	Proteinase K 1 : 100 37° C, 20 minutes (5) [35]	ABC, DAB Vector Laboratories
Method 3	p-synuclein, monoclonal [EP1536Y] ab51253 Abcam [36] 1 : 5,000	As above	As above.
Method 4	p-synuclein, monoclonal MJF-R13 (8-8) ab168381 Abcam 1 : 5,000	As above	As above.
Method 5	As above, 1 : 10,000	Proteinase K for 15 minutes (Bond Enzyme Pretreatment Kit)	DAB, BOND MAX Leica Biosystems, Newcastle, U.K.
Method 6	p-synuclein, monoclonal P-syn/81 ^a Biolegend [31] 1 : 5,000	As above.	As above.
Method 7	a-synuclein Monoclonal LB509 Invitrogen [37] 1 : 500	Formic acid 15 minutes Boiling citrate buffer 20 minutes [9]	ABC, DAB Vector Laboratories

scores in other peripheral nervous system locations. As the intent of the study was not to provide an unbiased estimate of LTS density in a representative sampling of PD subjects, but rather to test IHC methods, we hoped to instead select PD subjects with higher-than-average colonic LTS densities.

Alternating sets of 5 sections (e.g. Set 1 consisted of section number 1 plus every *n*th section thereafter; Set 2 consisted of section number 2 and every *n*th section thereafter, etc), as well as positive and negative control sections taken from autopsy-obtained cerebral cortex with and without LTS, were sent to four participating laboratories, who each stained one or more of the section sets with their own opti-

mized method and/or an assigned method (Table 2). These were the same four labs that had participated in the prior colon biopsy study [27]. Seven different IHC methods were used (Table 2). Primary antibodies included one polyclonal and three different monoclonal antibodies against alpha-synuclein phosphorylated at serine 129 (Methods 1–6) and one monoclonal antibody against alpha-synuclein without post-translational modifications (Method 7). Five different combinations of epitope exposure pretreatments and signal development protocols were used.

After preliminary examination, three staining patterns were considered as candidates for specific LTS. All three of these were morphologically consistent

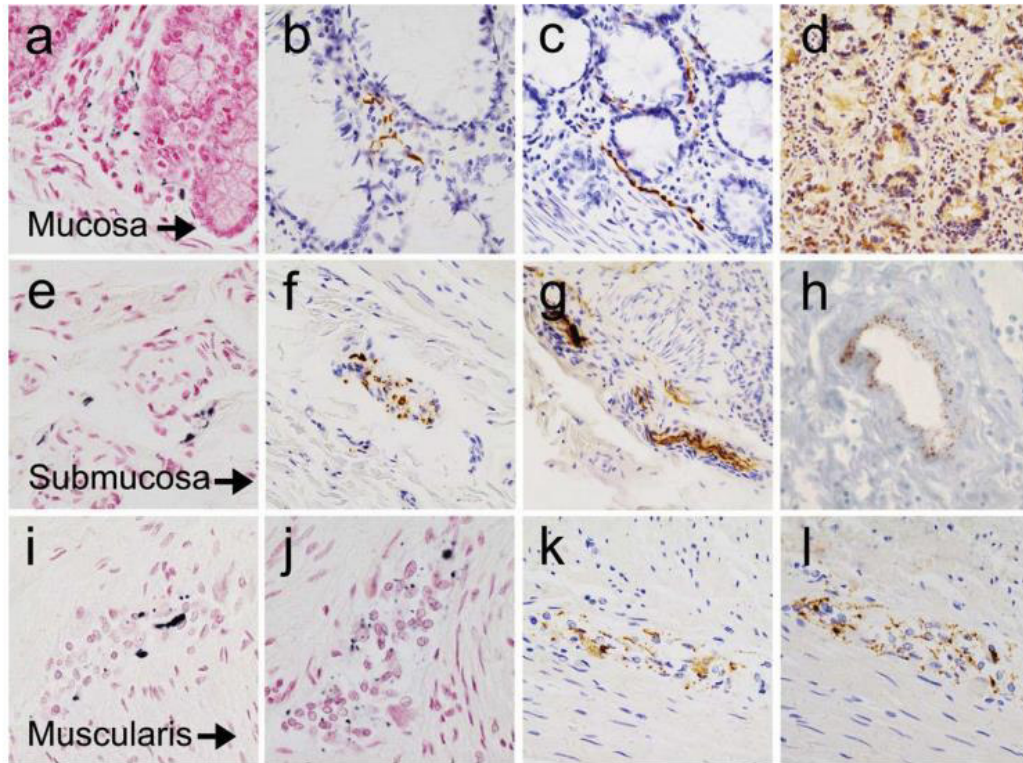


Fig. 1. Photomicrographs of the colon from autopsied PD subjects, stained immunohistochemically for phosphorylated α -synuclein. Panels (a–c) show fibers and dots within the lamina propria, with Method 3 (a) and Method 5 (b and c). Panel (d) shows non-specific staining of epithelial cells with Method 5. Panels (e–g) show fibers and dots within the submucosa, with Method 5 (e) and Method 6 (f and g). Panel (h) shows dots embedded within the vascular wall (graded with the “perivascular dots” template) of a blood vessel in the submucosa, photomicrograph from prior study [27]. Panels (i–l) show fibers and dots within the myenteric plexus, with Method 2 (i and j), Method 5 (k) and Method 6 (l). Specific staining is black, with a red counterstain (panels a, e, i and j), or brown, with a blue counterstain (remainder of panels).

with nerve fibers and/or puncta. Stained sections were graded blinded to diagnosis by the same four raters that performed this function for the prior biopsy study, using three custom templates devised after initial examination of the morphologies of presumptive specifically-stained structures (Fig. 1). Method 4 was graded by only three raters. The major template used to assign density grades, as with the prior biopsy study [27], was termed “fibers and dots” (dots synonymous with puncta), and was applied to slides stained with all methods (Fig. 2). The second template (“fibers only”) was used only for slides stained with Method 7, due to the presence of frequent non-specific puncta. The third template, also previously-used [27], was termed “perivascular dots”, and was used only for slides stained with Method 3, as it was not present

in slides stained with other methods. This template was used only for a particular morphological appearance of dots embedded in vascular walls. As for the prior biopsy study, semi-quantitative density scores (none, sparse, moderate and frequent) were assigned based on the highest density of stained structures at any single location and separately for mucosa, submucosa and muscularis (Fig. 2). The perivascular pattern of staining, being relatively infrequent, was graded without reference to layer. As non-specific, clearly artifactual staining (defined as being without meaningful morphological characteristics and/or found in slides from all subjects regardless of diagnosis) was present to some extent in slides produced with all methods, raters were instructed not to grade these types of staining. As non-specific staining of

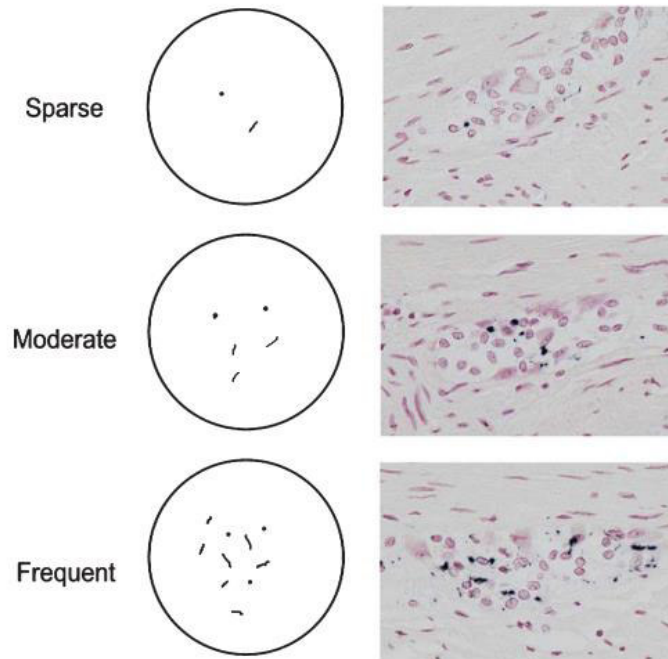


Fig. 2. Diagrammatic template (left series of panels) used for density grading of “dots and fibers” type of morphology. On the right series of panels are photomicrographs of sections stained with Method 2, showing examples of each density grade within the myenteric plexus of PD subjects. Specific staining is black, with a red counterstain.

epithelial cells was particularly common (diffuse staining of cytoplasm and intraluminal fecal material; an example is shown in Fig. 1d), mucosal grading was limited to the lamina propria with adjacent muscularis mucosa. Another relatively common type of non-specific staining was a granular pattern in the lamina propria, as described in the prior colonic biopsy study [27]. Following blinded grading, the score sheets were sent to a statistician, for whom the blind was then lifted.

The primary analysis was for the ability of a subject-level positive or negative designation to predict diagnostic status (PD or control). Any LTS score greater than zero, in any slide, from any layer, was regarded as defining that subject as positive for LTS. The diagnostic performance was expressed as sensitivity, specificity, Youden Index and inter-rater agreement (intra-class correlation coefficient, ICC). The Youden Index, a measure of overall diagnostic accuracy, equals sensitivity + specificity, expressed as decimals, minus one. It has a zero value when a diagnostic test gives the same proportion of positive results for groups with and without the disease, i.e.

when the test has no discriminatory value at all. A Youden Index of one indicates that there are no false positives or false negatives, i.e. when the test does not misclassify a single subject. Hereafter, to be concise, “diagnostic accuracy”, will refer to the relative performance of methods and raters as expressed by the Youden Index.

The density measures, along with prevalence of positive staining, were used in secondary analyses to compare the three colonic layers assessed.

The primary analysis aimed to first calculate diagnostic accuracy and inter-rater agreement with all colonic layers included, as it was considered likely that the muscularis layer, with its reportedly higher prevalence of LTS [3, 5, 10, 11], would be critical for this, and then to repeat the calculations with the muscularis excluded, so as to model the biopsy setting, where the muscularis layer is never obtained.

The results from these initial analyses were used to compare the histological methods and raters in terms of their ability to predict a PD diagnosis. The most accurate method and raters were then used to compare LTS density in the three colonic layers.

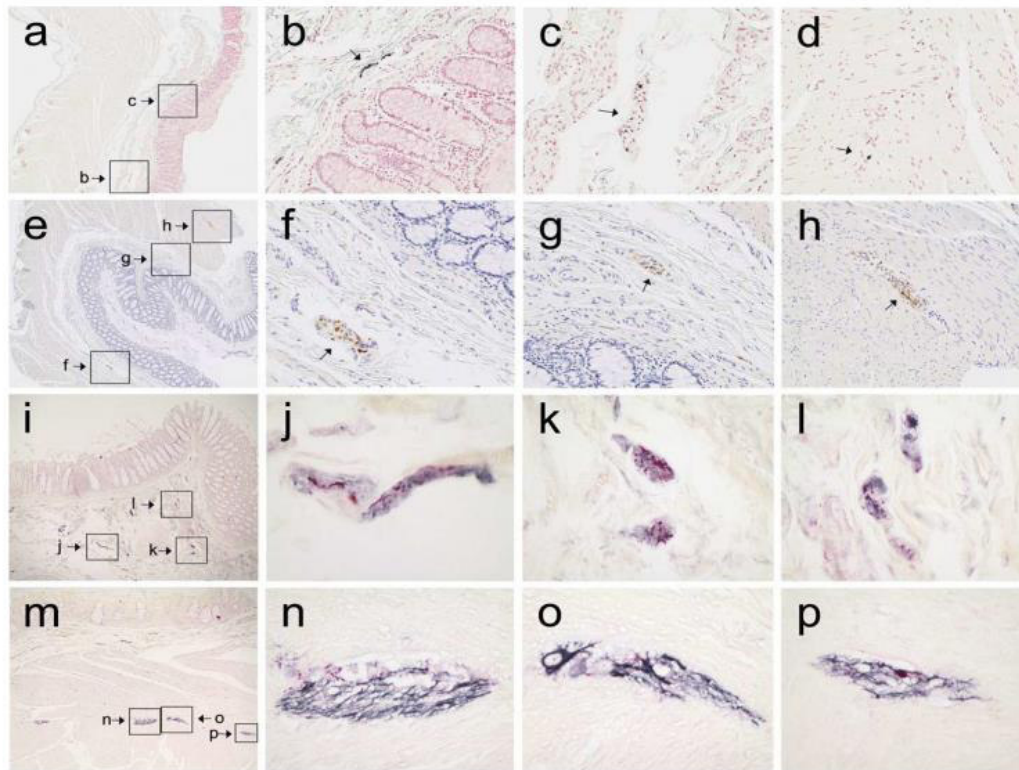


Fig. 3. Low-magnification photomicrographs (a, e) of the full thickness of the colonic wall from two PD subjects, stained immunohistochemically for phosphorylated α -synuclein with Method 4 (a) and Method 5 (e); boxes show the location of higher magnification features of interest (small arrows in b, c, f, g and h), including a large fiber in the submucosa (b), probable nerve fascicles in the submucosa (c, f and g) and probable nerve fascicles in the intermyenteric plexus (d and h; d located just outside the area depicted in a). Low magnification photographs (i, m) of the colonic wall from a PD subject, double-stained for phosphorylated α -synuclein and neurofilament protein; boxes show the location of higher magnification features of interest in the submucosa (j-l) and muscularis (m-p). Structures staining for phosphorylated α -synuclein are red while those staining for neurofilament are black; the counterstain is light red.

Two-color immunolabelling was used to confirm the neuronal origin of the “fibers and dots” staining morphology (Fig. 3). The same monoclonal antibody against phosphorylated α -synuclein utilized for the immunoperoxidase procedures in Methods 1 and 6 (P-syn/81[®]Biolegend [31]) was used in series with a rabbit polyclonal antibody against phosphorylated and non-phosphorylated neurofilament (Abcam ab 7795, Cambridge, MA). Signal development utilized an alkaline-phosphatase-activated red chromogen (Impact Red, Vector Laboratories, Burlingame, CA), in combination with a peroxidase-coupled bluish-black chromogen (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA; 3,3'-diaminobenzidine with saturated nickel ammonium sulfate and imidazole, Sigma, St. Louis, MO) [35].

RESULTS

The appearance of the staining with several different methods is depicted in Figs. 1–3. Overall, in most subjects, tissue elements exhibiting even the most common “fibers and dots” staining pattern were present at low densities. Double-staining of selected sections with an antibody raised against a pan-neuronal marker (neurofilament protein) confirmed the impression gained from morphology alone that the “fiber and dot” morphology represents neuronal structures (Fig. 3i-p). Additionally, most of the presumptive specifically-stained structures were present in an anatomical context consistent with neuronal tissue, such as within nerve fascicles in the submucosa or within the intermyenteric plexus of the muscularis.

Table 3

Intraclass Correlation Coefficient (ICC) and diagnostic performance for individual and grouped raters, using all scoring templates and three colonic layers

Rater	ICC	Sensitivity	Specificity	Youden Index
<i>Method 1</i>				
Rater 1		80%	100%	0.80
Rater 2		80%	60%	0.40
Rater 3		20%	60%	-0.20
Rater 4		80%	100%	0.80
All	0.17	65%	80%	0.45
<i>Method 2</i>				
Rater 1		80%	80%	0.60
Rater 2		80%	20%	0.00
Rater 3		40%	100%	0.40
Rater 4		80%	100%	0.80
All	0.28	70%	75%	0.45
<i>Method 3</i>				
Rater 1		80%	20%	0.00
Rater 2		80%	0%	-0.20
Rater 3		20%	100%	0.20
Rater 4		100%	0%	0.00
All	0.02	70%	30%	0%
<i>Method 4</i>				
Rater 1		100%	100%	1.00
Rater 2		80%	80%	0.60
Rater 4		80%	100%	0.80
All	0.74	87%	93%	0.80
<i>Method 5</i>				
Rater 1		100%	100%	1.00
Rater 2		80%	100%	0.80
Rater 3		20%	100%	0.20
Rater 4		100%	100%	1.00
All	0.65	75%	100%	0.75
<i>Method 6</i>				
Rater 1		100%	100%	1.00
Rater 2		80%	80%	0.60
Rater 3		40%	100%	0.40
Rater 4		80%	100%	0.80
All	0.64	75%	95%	0.70
<i>Method 7</i>				
Rater 1		100%	0%	0.00
Rater 2		80%	40%	0.20
Rater 3		80%	0%	-0.20
Rater 4		100%	20%	0.20
All	-0.12	90%	15%	0.05

Table 4

Intraclass Correlation Coefficient (ICC) and diagnostic performance for individual and grouped raters, with exclusion of data from the muscularis layer and the perivascular template

Rater	ICC	Sensitivity	Specificity	Youden Index
<i>Method 1</i>				
Rater 1		80%	100%	0.80
Rater 2		60%	80%	0.40
Rater 3		20%	80%	0.00
Rater 4		60%	100%	0.60
All	0.38	55%	90%	0.45
<i>Method 2</i>				
Rater 1		80%	100%	0.80
Rater 2		80%	40%	0.20
Rater 3		20%	100%	0.20
Rater 4		60%	100%	0.60
All	0.22	60%	85%	0.45
<i>Method 3</i>				
Rater 1		40%	100%	0.40
Rater 2		80%	40%	0.20
Rater 3		20%	100%	0.20
Rater 4		60%	100%	0.60
All	0.47	50%	85%	0.35
<i>Method 4</i>				
Rater 1		80%	100%	0.80
Rater 2		60%	100%	0.60
Rater 4		60%	100%	0.60
All	0.56	67%	100%	0.67
<i>Method 5</i>				
Rater 1		100%	100%	1.00
Rater 2		80%	100%	0.80
Rater 3		20%	100%	0.20
Rater 4		100%	100%	1.00
All	0.65	75%	100%	0.75
<i>Method 6</i>				
Rater 1		80%	100%	0.80
Rater 2		60%	80%	0.40
Rater 3		40%	100%	0.40
Rater 4		80%	100%	0.80
All	0.59	65%	95%	0.60
<i>Method 7</i>				
Rater 1		100%	20%	0.20
Rater 2		60%	40%	0.00
Rater 3		40%	0%	-0.60
Rater 4		100%	20%	0.20
All	-0.07	75%	20%	-0.05

Inter-rater agreement and mean diagnostic performance were both poor to moderate when data from all colonic regions (lamina propria, submucosa and muscularis), templates and raters were included (Table 3). Only Methods 4, 5 and 6 achieved a mean Youden Index greater than 0.5 as well as ICC scores greater than 0.5. As diagnostic performance with the "perivascular dots" template, used only for Method 3, was uniformly poor with all raters, this pattern of staining was regarded as non-specific and scores using this template were not utilized in subsequent calculations. The diagnostic performance for

Method 3 improved to an average Youden Index of 0.5 (from 0.0) after exclusion of results obtained with the perivascular template.

The next sets of analyses (Table 4) were performed after exclusion of results from the muscularis layer, to model the biopsy situation. Diagnostic accuracy was overall fairly similar to that obtained with inclusion of the muscularis layer (results not shown). Results again showed poor to moderate inter-rater agreement and diagnostic performance, with average ICC values ranging from -0.07 to 0.65 and average Youden indices varying from -0.05 to 0.75. Again, only

Methods 4, 5 and 6 achieved both a mean Youden Index greater than 0.5 as well as ICC scores greater than 0.5.

In a third set of analyses (Table 5), only the results from the two raters with mean Youden Indices greater than 0.5 were used (Raters 1 and 4 from Table 4, with mean Youden Indices of 0.7 and 0.625, respectively). The mean diagnostic performance and inter-rater agreement were both moderate to very good for Methods 1–6. Method 5 achieved 100% accuracy with both raters. Method 6 was 80% accurate with both raters while three other methods all achieved 70% accuracy, averaged across the two raters. In general, specificity was better than sensitivity; six methods had 100% specificity.

The results from Method 5 and the two most-accurate readers were then used to assess the prevalence, distribution and density of LTS within the three colon layers assessed (Table 6). Combining the scores from both raters, the submucosa had the highest prevalence of pathological LTS staining; 5/5 PD cases were positive for both raters in the submucosa versus 4/5 for the muscularis and 3/5 for the mucosa. The mean LTS density score within the mucosa was approximately 63% of that within the submucosa and muscularis, which were roughly equivalent.

DISCUSSION

This autopsy-based study, in contrast with the prior biopsy-based study by this same group [27], was successful in identifying several IHC methods with high accuracy for PD. The differing outcomes of the two studies were most likely due to several reasons, including: 1) the autopsy specimen was much larger and hence more likely to contain a much larger number of neuronal elements, which may have been absent or very sparse in the biopsy samples 2) the diagnosis of PD in each autopsied subject had been established through a full neuropathological examination, whereas the biopsied subjects had only a less-accurate, clinically-based diagnosis. 3) Positive or specific staining was defined as that with a mor-

Table 5

Inter-rater agreement (ICC), mean sensitivity, mean specificity and overall diagnostic performance (Youden Index) for the two most accurate raters' scores, after exclusion of results for the perivascular staining pattern and the muscularis layer

Method	ICC	Sensitivity	Specificity	Youden Index
Method 1	0.8	70%	100%	0.70
Method 2	0.8	70%	100%	0.70
Method 3	0.76	50%	100%	0.50
Method 4	0.8	70%	100%	0.70
Method 5	1.0	100%	100%	1.00
Method 6	0.58	80%	100%	0.80
Method 7	-0.11	100%	20%	0.20

phology consistent with a neuronal origin and/or a presence in an anatomical context consistent with a neuronal origin. In the prior biopsy study, all staining morphologies were accepted as potentially specific.

Several methods used in this study had acceptable diagnostic accuracy. Method 5 was the most accurate, in terms of both ICC and Youden Index. However, with only 5 subjects in each group, the 95% confidence intervals for sensitivity and specificity generally were very wide, ranging between 48% and 100%. Therefore the rank order of the top several methods might not be preserved with much larger subject numbers.

Raters may have widely varying accuracy. It is recommended that raters should receive more formalized training prior to commencing slide judging, in order to more clearly distinguish between truly positive LTS and common artifactual (non-specific or false-positive) staining patterns. Although a detailed training program, in slide-show format, was circulated to all raters, it would be preferable to conduct a training program in a videoconference format or in-person under a multi-headed microscope.

Positive and negative control slides were used, but control sections stained with omission of the primary antibody were not used; this may have resulted in a somewhat higher false-positive rate. However, it is noted that, with the two most accurate raters, specificities with several methods were very high (6 methods had 100% specificity), indicating a low rate

Table 6

Prevalence, distribution and densities of LTS within the five PD cases and the three colon layers assessed, using data from Method 5, showing individual results for the two most accurate raters as well as for their combined scores. Shown are the individual and combined rater prevalences (the percentage of PD cases found to have pathological staining) and mean density scores, with standard deviation in parentheses.

Rater	Mucosa	Submucosa	Muscularis	All Layers
Rater 1	40%; 0.61 (0.9)	100%; 1.26 (1.1)	60%; 0.84 (1.1)	100%; 0.87 (1.1)
Rater 2	80%; 0.92 (1.1)	100%; 1.16 (1.2)	100%; 1.56 (0.9)	100%; 1.24 (1.1)
Both Raters	60%; 0.76 (1.0)	100%; 1.21 (1.2)	80%; 1.2; (1.0)	100%; 1.05 (1.1)

of false-positive decisions. Also, all the antibodies used in the study have been extensively characterized.

Although this autopsy study identified several methods with useful accuracy for identifying PD subjects, positively-and specifically-stained nerve fibers were scarce and widely scattered in some subjects, raising concerns that randomly-acquired biopsies may often miss positive sites, resulting in a high false-negative rate with respect to a true PD diagnosis. Also, the amount of submucosa obtained in typical biopsies is often minimal. If colonic biopsies are to be used for studies of diagnostic accuracy, or to select subjects for clinical trials, multiple biopsy samples from each PD subject are therefore advisable to increase sensitivity. It is possible that future methods may have higher sensitivities.

Although prior studies had suggested that the muscularis layer had a considerably higher density and prevalence of LTS than the submucosa [3, 5, 10, 11], in this study they were roughly equivalent. This is a critical finding as biopsies do not contain the muscularis layer and therefore, to be a potentially useful diagnostic site, the submucosa and/or mucosa must contain an acceptable pathology prevalence. However, this was a small sample size, so this issue would need further exploration with a much larger and more diverse case series.

Due to our deliberate design to ensure adequate LTS densities in the PD colonic tissue, rather than sampling subjects to be representative of the PD population as a whole, we selected subjects with a long clinical symptom duration, averaging more than 15 years, and who had previously-demonstrated higher peripheral nervous system (submandibular gland and esophagus) LTS scores. Also, by coincidence, all the PD subjects were males. As a result of this deliberately-biased sampling, the prevalences and densities of colonic LTS in this small subset of PD cases are likely to be higher than that expected for the general PD population.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (Grant ID: 9035.01). The Banner Sun Health Research Institute Brain and Body Donation Program is supported by the National Institute of Neurological Disorders and Stroke (U24 NS072026 National Brain and Tissue Resource for Parkinson's Disease and Related Disorders), the National Institute on Aging

(P30 AG19610 Arizona Alzheimer's Disease Core Center), the Arizona Department of Health Services (contract 211002, Arizona Alzheimer's Research Center), the Arizona Biomedical Research Commission (contracts 4001, 0011, 05-901 and 1001 to the Arizona Parkinson's Disease Consortium) and the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. AGC is a recipient of a "poste d'accueil Inserm".

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to report.

REFERENCES

- Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, & Hamilton SR (1984) Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology*, **87**, 848-856.
- Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, & Cote LJ (1987) Parkinson's disease and megacolon: Concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology*, **37**, 1253-1255.
- Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, & Ikuta F (1988) Parkinson's disease: The presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol*, **76**, 217-219.
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, & Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*, **396**, 67-72.
- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, Vignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, & Neunlist M (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut*, **57**, 1741-1743.
- Beach TGJ, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White III CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG, & Arizona Parkinson's Disease Consortium (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, **119**, 689-702.
- Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & Derkinderen P (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*, **22**, e11-e14.
- Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, & Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*, **5**, e12728.
- Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M, Derkinderen P (2010) Biopsable neural tissues: Toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front Psychiatry* **1**, 128.
- Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, & Kordower JH (2012) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*, **27**, 709-715.

- [11] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Varannes des SB, Neunlist M, & Derkinderen P (2012) A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil*, **24**, e202-e205.
- [12] Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, & Greene JG (2012) Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol*, **124**, 665-680.
- [13] Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, Broughton E, Hagan H, & Carroll C (2013) Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, **127**, 235-241.
- [14] Gold A, Turkalp ZT, & Munoz DG (2013) Enteric alpha-synuclein expression is increased in Parkinson's disease but not Alzheimers disease. *Mov Disord*, **28**, 237-240.
- [15] Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Martí MJ, Hernández I, Valdeoriola F, Reñé R, & Ribalta T (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord*, **29**, 1010-1018.
- [16] Masuda H, Asahina M, Oide T, Wakita H, Sekiguchi Y, Araki N, & Kuwabara S (2014) Antemortem detection of colonic α -synuclein pathology in a patient with pure autonomic failure. *J Neurol*, **261**, 2451-2452.
- [17] Visanji NP, Marras C, Hazrati L-N, Liu LWC, & Lang AE (2014) Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov Disord*, **29**, 444-450.
- [18] Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A, Zorenkov D, Deuschl G, & Wedel T (2015) Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol*, **23**, 247-261.
- [19] Visanji NP, Marras C, Kern DS, Dakheel AI, Gao A, Liu LW, Lang AE, & Hazrati LN (2015) Colonic mucosal alpha-synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology*, **84**, 609-616.
- [20] Chung SJ, Kim J, Lee HJ, Ryu H-S, Kim K, Lee JH, Jung KW, Kim MJ, Kim MJ, Kim YJ, Yun SC, Lee JY, Hong SM, & Myung SJ (2015) Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord*, **31**, 241-249.
- [21] Woulfe JM, Gray MT, & Munoz G (2015) Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology*, **85**, 834.
- [22] Unger MM, & Sakakibara R (2015) Does REM sleep behavior disorder have the guts to be Parkinson disease?. *Neurology*, **85**, 1732-1733.
- [23] Sprenger FS, Stefanova N, Gelpi E, Seppi K, Navarro-Otano J, Offner F, Vilas D, Valdeoriola F, Pont-Sunyer C, Aldecoa I, Gaig C, Gines A, Cuatrecasas M, Högl B, Frauscher B, Iranzo A, Wenning GK, Vogel W, Tolosa E, & Poewe W (2015) Enteric nervous system α -synuclein immunoreactivity in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology*, **85**, 1761-1768.
- [24] Ruffmann C, & Parkkinen L (2015) Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology*, **85**, 834.
- [25] Cersosimo MG (2015) Gastrointestinal biopsies for the diagnosis of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Gastroenterol Res Pract*, **2015**, 476041.
- [26] Xuan Q, Zhang YX, Liu DG, Chan P, Xu SL, & Cui YQ (2016) Post-translational modifications of α -synuclein contribute to neurodegeneration in the colon of elderly individuals. *Mol Med Rep*, **13**, 5077-5083.
- [27] Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, & Borghammer P (2016) Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal parkinson's disease patients. *Ann Neurol*, **79**, 940-949.
- [28] Corbillé AG, Letournel F, Kordower JH, Lee J, Shanes E, Neunlist M, Munoz DG, Derkinderen P, & Beach TG (2016) Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies. *Acta Neuropathol Commun*, **4**, 35.
- [29] Adler CH, Beach TG, Hentz JG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E, Sabbagh MN, Sue LI, Jacobson SA, Belden CM, & Dugger BN (2014) Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: Clinicopathologic study. *Neurology*, **83**, 406-412.
- [30] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Serrano G, Shill HA, Walker DG, Lue L, Roher AE, Dugger BN, Maarouf C, Birdsill AC, Intorcchia A, Saxon-Labelle M, Pullen J, Scroggins A, Filon J, Scott S, Hoffman B, Garcia A, Caviness JN, Hentz JG, Driver-Dunckley E, Jacobson SA, Davis KJ, Belden CM, Long KE, Malek-Ahmadi M, Powell JJ, Gale LD, Nicholson LR, Caselli RJ, Woodruff BK, Rapsack SZ, Ahern GL, Shi J, Burke AD, Reiman EM, & Sabbagh MN (2015) Arizona study of aging and neurodegenerative disorders and brain and body donation program. *Neuropathology*, **35**, 354-389.
- [31] Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Sasse J, Boyer S, Shirohi S, Brooks R, Eschbacher J, White CL, 3rd, Akiyama H, Caviness J, Shill HA, Connor DJ, Sabbagh MN, Walker DG, & Arizona Parkinson's Disease Consortium (2009) Unified staging system for Lewy body disorders: Correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol*, **117**, 613-634.
- [32] Waxman EA, & Giasson BI (2008) Specificity and regulation of casein kinase-mediated phosphorylation of alpha-synuclein. *J Neuropathol Exp Neurol*, **67**, 402-416.
- [33] Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, & Iwatsubo T (2002) Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*, **4**, 160-164.
- [34] Obi K, Akiyama H, Kondo H, Shimomura Y, Hasegawa M, Iwatsubo T, Mizuno Y, & Mochizuki H (2008) Relationship of phosphorylated alpha-synuclein and tau accumulation to Abeta deposition in the cerebral cortex of dementia with Lewy bodies. *Exp Neurol*, **210**, 409-420.
- [35] Walker DG, Lue LF, Adler CH, Shill HA, Caviness JN, Sabbagh MN, Akiyama H, Serrano GE, Sue LI, Beach TG, & Arizona Parkinson Disease Consortium (2013) Changes in properties of serine 129 phosphorylated alpha-synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. *Exp Neurol*, **240**, 190-204.
- [36] Beach TG, White CL, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, Leverenz JB, Roncaroli F, Buttini M, Hladik CL, Sue LI, Noorigian JV, & Adler CH (2008) Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol*, **116**, 277-288.
- [37] Schell H, Hasegawa T, Neumann M, & Kahle PJ (2009) Nuclear and neuritic distribution of serine-129 phosphorylated alpha-synuclein in transgenic mice. *Neuroscience*, **160**, 796-804.
- [38] Giasson BI, Uryu K, Trojanowski JQ, & Lee VM (1999) Mutant and wild type human alpha synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J Biol Chem*, **274**, 7619-7622.

2.1.4 Evaluation de la prévalence de la STL à partir de la méthode d'IHC optimale précédemment identifiée dans des biopsies coliques de patients parkinsoniens

(Données non publiées)

Contexte :

L'étude précédente a permis d'identifier des méthodes fiables de détection de la STL dans les sections de colon inclus en paraffine obtenu par autopsie. La méthode la plus performante était celle que notre équipe avait effectuée dans le laboratoire de neuropathologie du CHU d'Angers. Nous avons donc cherché à réévaluer la détection de la STL dans nos biopsies coliques archivées, de la même manière que dans notre étude préliminaire, mais en utilisant cette fois-ci cette nouvelle méthode.

Méthodes :

La méthodologie était globalement similaire à celle décrite dans le paragraphe 1.1.1. En résumé, nous avons effectué des coupes de 4µm issues de biopsies coliques incluses en paraffine obtenues au cours de l'étude « Entérolark », 9 biopsies provenant de 3 sujets témoins et 6 biopsies provenant de sujets parkinsoniens. Après déparaffinage, les coupes ont subi une IHC avec l'automate Leica Bond III. Le démasquage antigénique a consisté en un prétraitement avec la protéinase K, pendant 15 minutes (Kit de prétraitement enzymatique Bond), et l'anticorps utilisé était dirigé contre la P-Ser-129- α -synucléine (clone MJF-R13, ab168381, Abcam), monoclonal, dilué à 1 : 10 000. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase était révélé par la coloration DAB (BOND MAX Leica Biosystems, Newcastle, U.K). Les coupes ont été visualisées par un microscope Leica et une analyse semi quantitative du marquage a été effectuée sur l'ensemble de la coupe.

Résultats :

Cette expérience a été réalisée à deux reprises de façon indépendante. Nous avons pu constater à chaque fois que la coupe de biopsie colique servant de contrôle négatif, **ie** non incubée avec

l'anticorps primaire avaient un marquage DAB positif, proche de celui observé dans les coupes incubées avec l'anticorps primaire. Il n'était alors pas possible de distinguer le marquage non spécifique du marquage de la P-Ser129- α -syn et la prévalence de la STL dans nos biopsies n'a pu être déterminée.

Discussion :

La discordance des résultats obtenus entre nos biopsies coliques incluses en paraffine et celles issues des prélèvements autopsiques fournies par le laboratoire de Thomas Beach (Banner Sun Health Research Institute Brain and Body Donation Program) peut provenir de plusieurs raisons. La principale est celle de la qualité des coupes. Nos coupes sont issues de biopsies incluses en paraffine archivées à température ambiante depuis 2007. La durée de la fixation du prélèvement dans la formaline peut avoir été différente entre les blocs. Enfin nos coupes ont une épaisseur plus petite, de 4 μ m au lieu de 6 μ m pour les coupes de colon autopsié.

En conclusion, nos travaux mettent en évidence que l'IHC visant à détecter la STL dans les prélèvements gastro-intestinaux est un outil diagnostique prometteur mais nous avons actuellement besoin d'études standardisées multicentriques à grande échelle afin de déterminer la sensibilité et la spécificité vis-à-vis de la MP. Pour optimiser les valeurs diagnostiques du biomarqueur il est probable qu'il faille combiner l'approche IHC en utilisant plusieurs sources de tissus accessibles du vivant du patient, telles que les BGSA, les biopsies de peau avec les biopsies gastro-intestinales. Enfin il serait utile d'avoir une approche complémentaire à l'IHC de détection de la STL entérique, par exemple biochimique. C'est dans cette problématique que s'inscrivent les travaux que je vais vous présenter dans la 2eme partie de ce manuscrit.

2.2 Apport de l'analyse biochimique de l' α -synucléine dans le SNE

« Les seules vraies erreurs sont celles que nous commettons à répétition.

Les autres sont des occasions d'apprentissage.» Dalai Lama

Des efforts considérables ont été faits pour chercher à comprendre le rôle de l' α -synucléine dans la physiopathologie de la MP. Il est actuellement admis que ses propriétés prion-like sous-tendent son processus de diffusion spatiotemporelle, mais son pattern de progression au cours de la maladie n'est pas bien identifié ni compris. L'hypothèse principale est celle d'une propagation centripète de l' α -synucléine pathologique du bulbe olfactif ou du SNE vers le SNC (Del Tredici and Braak, 2016). Alors qu'il existe un nombre important d'études visant à caractériser l' α -synucléine présente dans le SNC, très peu d'études sont publiées sur les propriétés biophysiques et biochimiques de l' α -synucléine entérique. Ces données sont intéressantes pour la compréhension de la physiopathologie de la maladie, à savoir où se situe l'origine de l' α -synucléine pathologique et comment se propage-t-elle d'un tissu à un autre, et apportent également des informations complémentaires aux analyses immunohistochimiques dans l'optique du développement d'un biomarqueur précoce de la MP.

Nous avons donc cherché à caractériser l' α -synucléine présente dans le SNE en conditions physiologiques et dans la MP.

2.2.1 Optimisation de la détection de l'α-synuléine endogène par western blot dans le SNE

Résumé des résultats publiés dans Journal of Parkinson Disease (Preterre et al., 2015)

ARTICLE 4. Optimizing Western Blots for the Detection of Endogenous α-Synuclein in the Enteric Nervous System

Preterre C, Corbillé AG, Balloy G, Letournel F, Neunlist M, Derkinderen P.

J Parkinsons Dis. 2015;5(4):765-72. doi: 10.3233/JPD-150670.

Contexte

Les inclusions intra-neuronales d'α-synucléine, lésions caractéristiques de la MP, ne sont pas limitées au SNC, mais affectent également le SNE. Ceci suggère que les lésions du SNE pourraient refléter la pathologie du SNC et offrir une source originale de biomarqueurs pour la MP. Toutefois, compte-tenu des résultats parfois contradictoires des études et des difficultés techniques de la détection de la STL par IHC, l'utilité de la détection de l'α-synucléine dans les biopsies gastro-intestinales à visée diagnostique de la MP est sujette à débat.

Objectif

L'objectif de cette étude est de proposer une méthode de western blot optimisée pour la détection de l'α-synucléine dans le SNE qui pourrait être utilisée en complément de l'analyse immunohistochimique.

Méthodes

Des cultures primaires de SNE de rat et des homogénats d'intestin grêle humain ont été analysées par Western Blot en utilisant sept anticorps primaires différents dirigés contre l'α-synucléine totale ou contre la forme phosphorylée sur la Sérine 129 ainsi que deux méthodes qui augmentent la rétention à la membrane de western blot l'α-synucléine, à savoir l'incubation

des membranes avec du paraformaldehyde (PFA) ou le traitement des échantillons avec l'agent « crosslinker » dithiobis [succinimidylpropionate] (DSP).

Résultats

La fixation de la membrane suivante avec le PFA a permis une amélioration modérée de la détection endogène entérique l' α -synucléine, valable que pour deux des sept anticorps testés pour la révélation. L'immunodétection de l' α -synucléine entérique totale et phosphorylée a par contre été nettement améliorée lorsque les échantillons ont été traités avec le DSP, et ce quel que soit l'anticorps utilisé.

Conclusion

Nos résultats démontrent que la détection de l' α -synucléine dans le tube digestif par Western Blot peut être optimisée en utilisant des procédés visant à améliorer la rétention de la membrane de la protéine. Un tel protocole optimisé ouvre la voie à la quantification de l' α -synucléine dans les biopsies gastro-intestinales et au développement de nouveaux biomarqueurs de la MP.

Optimizing Western Blots for the Detection of Endogenous α -Synuclein in the Enteric Nervous System

Cécile Preterre^{a,b,c,1}, Anne-Gaëlle Corbillé^{a,b,c,1}, Gaëlle Balloy^{a,b,c}, Franck Letournel^{d,e}, Michel Neunlist^{a,b,c,f} and Pascal Derkinderen^{a,b,c,*}

^aInserm, U913, Nantes, F-44093, France

^bNantes University, Nantes, F-44093, France

^cCHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, F-44093, France

^dCHU Angers, Neurobiology and Neuropathology Laboratory, Angers F-49033, France

^eUniversité of Angers, UPRES EA3143, F-49033, France

^fCHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

Abstract.

Background: Alpha-synuclein containing inclusions in neurons, the characteristic pathological lesions of Parkinson's disease (PD), are not limited to the central nervous system, but also affect the enteric nervous system (ENS). This suggests that the ENS offer some potential as a surrogate of central nervous system pathology and that it may represent an original source of biomarkers for PD. However, the usefulness of α -synuclein detection in gastrointestinal biopsies as a biomarker for PD is still unclear, as the different immunohistochemical methods employed to date have led to conflicting results.

Objective: Our aim is to propose an optimized immunoblotting method for the detection of endogenous α -synuclein in the healthy ENS that may be used to supplement the immunohistochemical analysis.

Methods: Primary culture of rat ENS and homogenates of human small intestine were analyzed by Western Blot using seven different α -synuclein and phospho- α -synuclein antibodies along with two methods that increase α -synuclein retention on blot membranes, namely incubation of the membranes with paraformaldehyde (PFA) or treatment of samples with the crosslinker dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP).

Results: A moderate improvement in the detection of endogenous enteric α -synuclein was observed following membrane fixation with PFA for only two of the seven antibodies we tested. Immunodetection of total and phosphorylated α -synuclein in the ENS was markedly improved when samples were treated with DSP, regardless of the antibody used.

Conclusions: Our results demonstrate that the detection of α -synuclein in the gut by Western Blot can be optimized by using methods for enhanced membrane retention of the protein along with the appropriate antibody. Such an optimized protocol opens the way to the development of novel biomarkers for PD that will enable a quantification of α -synuclein in gastrointestinal biopsies.

Keywords: Alpha-synuclein, enteric nervous system, Western Blot, Parkinson's disease

INTRODUCTION

α -Synuclein is a small 140-amino acid protein that has special relevance for the neuropathological

assessment of Parkinson's disease (PD). In the late 1990s, Lewy bodies and neurites, the characteristic pathological lesions of PD, were discovered to have a strong α -synuclein and phosphorylated α -synuclein immunoreactivity [1]. Since then, α -synuclein and phosphorylated α -synuclein immunostaining has become the method of choice for the detection of PD pathology [2, 3] leading to a reassessment of the distribution of Lewy pathology in the central nervous

¹Equal contributors.

*Correspondence to: Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. Tel.: +33 240087924; Fax: +33 240087506; E-mails: derkinderenp@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr.

system and in peripheral autonomic systems by several different groups [4, 5]. Using this approach, it has been demonstrated that the vast majority of PD patients exhibit α -synuclein or phospho- α -synuclein immunoreactive lesions within their enteric nervous system (ENS) [4], an autonomic neuronal network that is readily and repeatedly accessible to routine gastrointestinal biopsies [6]. These specific features suggest that the ENS offers some potential as a surrogate of brain pathology and that it might represent an original source of biomarkers for PD [7, 8].

We have shown that the analysis of a single microdissected gastrointestinal biopsy by immunohistochemistry enables the detection of Lewy pathology in nearly ¾ of PD patients [6]. Although the microdissection technique we have developed provides outstanding information on the morphology of enteric neurons, it nonetheless has several limitations as it needs to be performed immediately after the endoscopic procedure and requires a skilled technician [6]. A subsequent study that used deparaffinized biopsy samples without microdissection demonstrated the presence of α -synuclein aggregates in the sigmoid colon of PD patients with a high sensitivity and specificity [9] but other groups did not confirm these results [10]. Furthermore, in all histological techniques employed to date, quantification of α -synuclein deposition and subsequent determination of a positive signal remains somewhat ambiguous [9, 11–14]. In this context, it is worth noting that none of the available studies on the expression and distribution of α -synuclein in the gut have been performed using standard Western blotting [12, 13, 15, 16], despite the generally higher sensitivity of the latter technique compared to immunohistochemistry. Two recent papers elegantly demonstrated that the detection of α -synuclein in neuronal cell lines and brain samples by Western blotting was more delicate and difficult than previously thought as the protein is easily washed off the membrane when a routine blotting procedure is used [17, 18]. They have therefore

developed two simple methods to increase Western blot signals of α -synuclein by improving its retention on blot membranes using either incubation of the membranes with paraformaldehyde (PFA) [17] or treatment of the samples with the crosslinker dithio-bis[succinimidylpropionate] (DSP) [18]. In order to optimize the detection of endogenous α -synuclein by immunoblotting in the ENS, we evaluated these two approaches in gut samples using several routinely used α -synuclein and phosphorylated- α -synuclein antibodies.

MATERIAL AND METHODS

Recombinant α -synuclein, primary culture of ENS and human tissues

Recombinant α -synuclein was from Sigma (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Primary cultures of ENS was generated and cultured as previously described [19]. Human brain samples were obtained from a coronal frozen section of a human brain devoid of neurodegeneration. A specimen of human small intestine (ileum) was obtained from one neurologically unimpaired subject who underwent intestinal resection for volvulus. Tissues samples used for the current study were from macroscopically normal segments of uninvolved resection margins. The study was approved by the *Fédération des bibliothèques* of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human, and registered under the no. DC-2008-402.

Sample preparation from cultured cells and tissues

At 13 days, primary culture of rat ENS was harvested in NETF buffer (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, and 50 mM NaF) containing 1% (v/v) Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), phosphatase inhibitor cocktail II (Roche, Neuilly sur Seine, France) and protease

Table 1
Alpha-synuclein and phospho- α -synuclein specific antibodies used in the current study

Name	Immunogen	Source, reference and dilution
Syn-1	Rat aa 15–123, human aa 91–99	BD Bioscience, mouse monoclonal (1:1000)
(C20)-R	Human C-terminus	SCBT, sc-7011-R, rabbit polyclonal (1:1000)
LB509	Human aa 115–122	Abcam, ab27766, mouse monoclonal (1:1000)
Syn211	Human aa 121–125	SCBT, sc-12767, mouse monoclonal (1:1000)
EP1536Y	Human aa sequence around $\textcircled{P}$ Ser129	Abcam, ab51253, rabbit monoclonal (1:500)
pSyn#64	Human aa sequence around $\textcircled{P}$ Ser129	Wako, 015-25191, mouse monoclonal (1:500)
p- α -syn	Human aa sequence around $\textcircled{P}$ Ser129	SCBT, sc-135638, rabbit polyclonal (1:500)

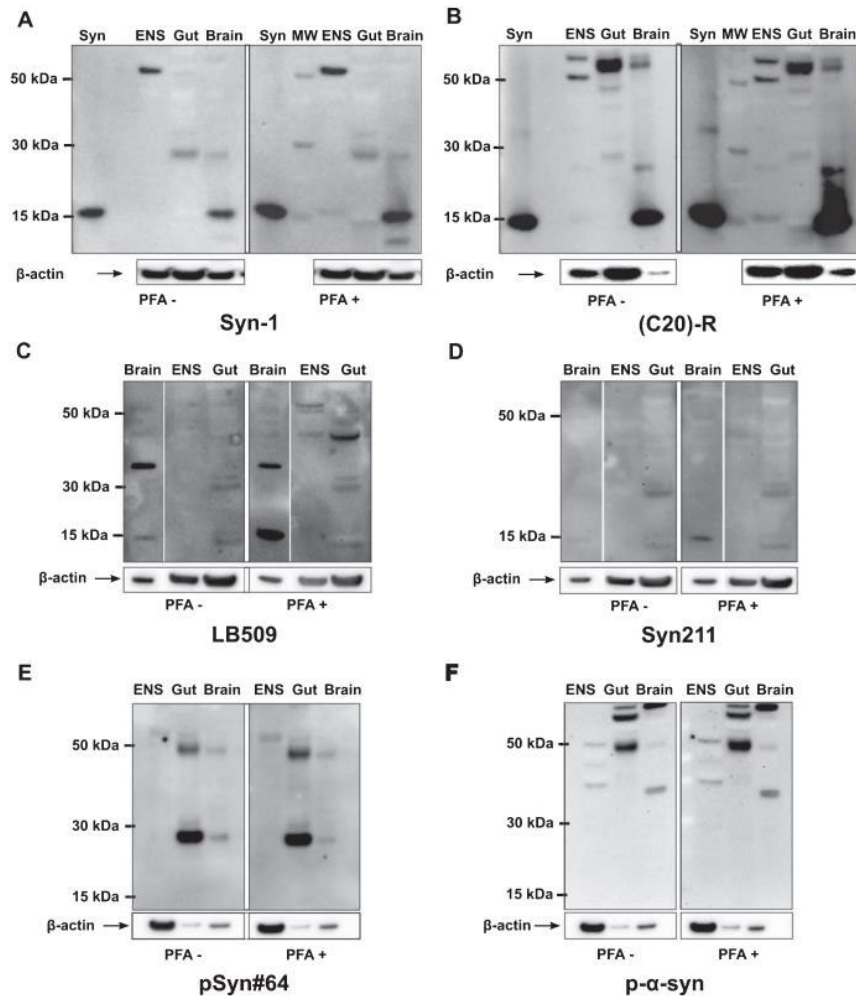


Fig. 1. Immunoblotting of endogenous α -synuclein in the ENS using various antibodies and membrane fixation with PFA. Recombinant α -synuclein (3 ng), homogenates of human small intestine (Gut; 15 to 25 μ g per lysate), brain cortex (Brain; 3 μ g per lysate) and lysates of primary culture of ENS (ENS) were subjected to immunoblot analysis. MW is for molecular weight markers. PVDF membranes were either fixed with 10% acetic acid (PFA-) or 0.4% PFA (PFA+) for 30 min. Antibodies specific for α -synuclein were used for the detection of endogenous α -synuclein: (A) Syn-1; (B) (C20)-R; (C) LB509; (D) Syn211 and phosphorylated α -synuclein: (E) pSyn#64; (F) p- α -syn. β -actin was used as a loading control. PFA- and PFA+ membranes were exposed identically. Immunoblots are representative of two independent experiments.

inhibitors cocktail (Roche). Tissues were lysed NETF/Igepal buffer, homogenized using the "Precellys 24" tissue homogenizer (Bertin technologies, Saint Quentin-en-Yvelines, France), sonicated and centrifuged at 16000 g for 20 minutes at 4°C.

Electrophoresis and immunoblotting

Total protein concentrations were determined by Bradford assay (Pierce, Thermo Scientific, Illkirch, France) using Varioskan™ (Thermo Scientific,

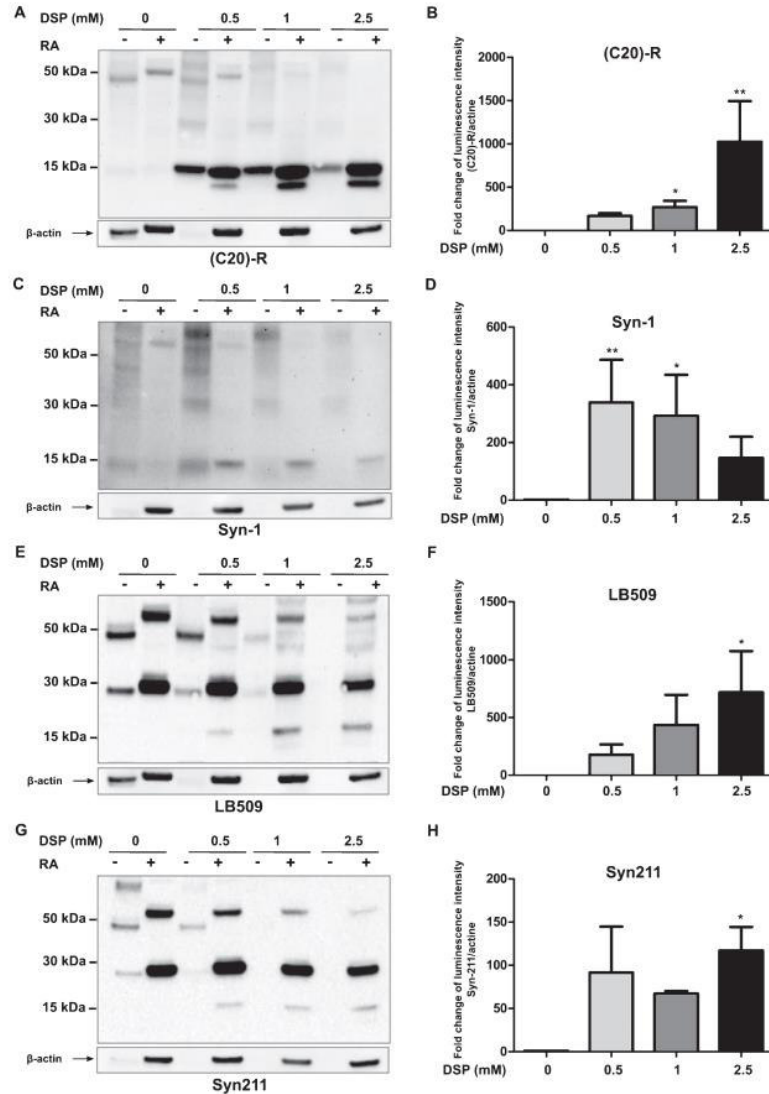


Fig. 2. Immunoblotting of total α -synuclein in the ENS using crosslinking with DSP. Homogenates of human small intestine (15 μ g per lysate) were incubated with DMSO only (0) or with a gradient of 0.5, 1.0 and 2.5 mM of DSP followed by boiling in sample buffer containing or not DTT, a reducing agent (RA) that cleaves the disulfide bonds of DSP. Immunoblot analysis was performed with (C20)-R (A), Syn-1 (C), LB509 (E), and Syn-211 (G) antibodies with PVDF membranes fixed with 10% acetic acid for 10 min. For quantification, the optical densities of the 15-kDa monomeric α -synuclein immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities β -actin immunoreactive bands in the same samples, and expressed as fold change relative to the condition with DMSO only (0) for (C20)-R (B), Syn-1 (D), LB509 (F), and Syn-211 (H). Data correspond to means $\pm$ SEM of 4 to 7 samples per condition. Statistical analysis was done with Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test, * p < 0.05 and ** p < 0.01 versus DMSO group.

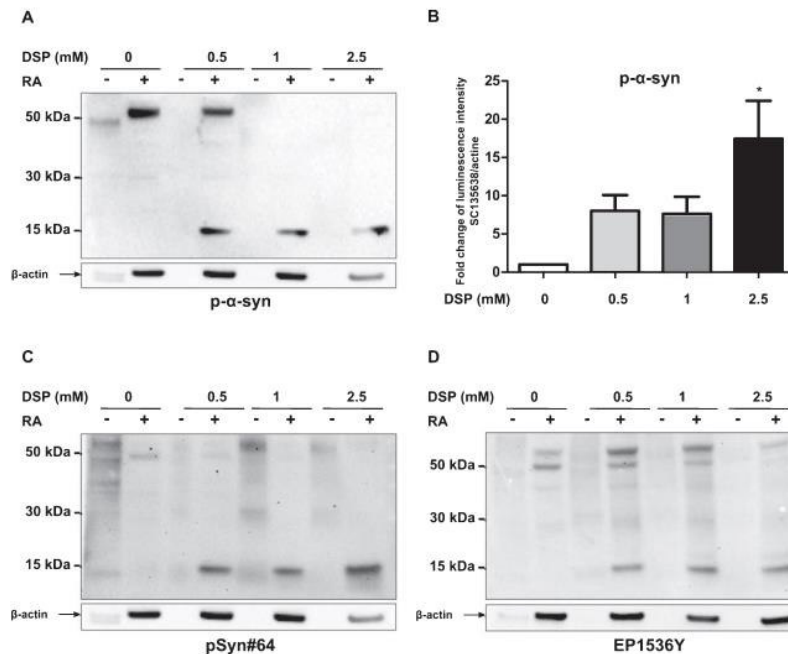


Fig. 3. Immunoblotting of phosphorylated α -synuclein in the ENS using crosslinking with DSP. Homogenates of human small intestine were analyzed similarly as in Fig. 2 and samples were blotted with p- α -syn (A), EP1536Y (C) and pSyn#64 (D) antibodies, which are specific for α -synuclein phosphorylated at serine 129. Quantification was carried out for p- α -syn (B) as in Fig. 2. Data correspond to means $\pm$ SEM of 3 to 4 samples per condition. Data correspond to means $\pm$ SEM of 5 to 6 samples per condition. Statistical analysis was done with Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test, * $p < 0.05$ versus DMSO group.

Waltham, Massachusetts, United States). The crosslinker dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP) (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO at 25X final concentration, added to the sample to obtain the desired final concentration and incubated for 30 min at 37°C with rotation [18]. Controls were treated with an equivalent volume of DMSO. Samples were further prepared for electrophoresis by diluting with NuPAGE sample buffer with or without 50 mM dithiothreitol (DTT), then heated at 70°C for 10 min. Lysates were separated using the NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels MiniGels™ (Life technologies, Cergy-Pontoise, France) together with the 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate (MES-SDS) running buffer before electrophoretic transfer to PVDF membranes with the iBlot™ Dry Blotting System also from Invitrogen. Post-transfer membranes were fixed either with 10% (v/v) acetic acid for 10 min or 0.4% PFA (v/v) for

30 min. Membranes were then blocked for one hour at room temperature in Tris-buffered saline (TBS) (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) with 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. Details on the primary antibodies against α -synuclein are summarized in Table 1; mouse monoclonal anti- β -actin antibody was from Sigma and used at 1:5000. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Life technologies, diluted 1:5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (Clarity ECL, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). When necessary, membranes were incubated in stripping buffer containing 500 mM Tris-HCl with 0.1M β -mercaptoethanol and 2% (v/v) sodium dodecyl sulfate for 20 min at 60°C, followed by extensive washing in TBS before reblocking for 30 min in TBS with 5% non-fat dry milk and reprobing. The relevant immunoreactive bands

were captured using ChemiDoc MP and analyzed with Image Lab (Biorad). The value of α -synuclein or phosphorylated α -synuclein was normalized to the amount of β -actin, for comparison between samples and expressed as a fold change relative to control condition.

Statistics

All data are given as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). For experiments with DSP, data were analyzed using non-parametric Kruskal Wallis test with Dunn's post test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

PFA FACILITATES THE DETECTION OF α -SYNUCLEIN IN THE ENS WHEN (C20)-R AND SYN-1 ANTIBODIES ARE USED

Previously, Lee and Kamitani [17] reported that endogenous α -synuclein from various cell lines can be efficiently detected by immunoblotting when blotted membranes are fixed with 0.4% PFA. We therefore compared Western blotting with a conventional method of membrane fixation (10% acetic acid) [20, 21] with PFA fixation to detect endogenous α -synuclein in rat primary culture of ENS, samples of human small intestine and cerebral cortex using four different antibodies to total α -synuclein as well as three different phospho- α -synuclein antibodies (Table 1).

All four α -synuclein antibodies detected endogenous monomeric 15-kDa α -synuclein from human brain when blotting membranes were fixed with acetic acid (Fig. 1A–D), a signal that was further enhanced when membranes were PFA-fixed (Fig. 1A–D). Endogenous α -synuclein in primary culture of rat ENS and human small intestine was barely or not detected after fixation of membranes with acetic acid, regardless of the antibody used (Fig. 1A–D). Membrane fixation with PFA enabled to detect endogenous monomeric α -synuclein in these two intestinal tissues when (C20)-R and Syn-1, but not LB509 and Syn211 antibodies were used (Fig. 1A–D). Densitometry of these immunoblots showed that the α -synuclein signal intensity obtained with (C20)-R and Syn-1 in human small intestine was respectively ≈ 1.5 and ≈ 2.75 higher when membranes were PFA- rather than acetic acid-fixed. Brain and gut monomeric α -synuclein was not detected with any of the three phospho- α -synuclein antibodies tested, even when membranes were PFA-fixed (Fig. 1E, F and data not shown for EPI1536Y).

DSP ALLOWS OPTIMAL DETECTION OF TOTAL AND PHOSPHORYLATED α -SYNUCLEIN IN THE ENS

Newman et al. recently showed that treatment of cell lysates and human brain homogenates with DSP followed by cleavage with a reducing agent enhanced α -synuclein immunoreactivity [18]. In a first set of experiments, we applied this method to the detection of endogenous α -synuclein in the ENS using antibodies to total α -synuclein (Table 1). Small intestine homogenates were treated with vehicle alone (DMSO) or with concentration gradients of 0.5, 1.0 and 2.5 mM of DSP in the absence or presence of the reducing agent dithiothreitol (DTT). Treatment of small intestine homogenates with DSP and DTT resulted in an increased 15-kDa monomeric α -synuclein signal that was maximal at 2.5 mM when (C20)-R (Fig. 2A, B), LB509 (Fig. 2E, F) and Syn211 (Fig. 2G, H) were used and at 1 mM when Syn-1 immunoblotting was performed (Fig. 2C, D). A similar marked enhancement of monomeric α -synuclein signal by DSP/DTT, peaking at 2.5 mM, was also observed with antibodies specific for α -synuclein phosphorylated at serine 129 (Fig. 3). The specificity of the cross-linking was supported by the lack of effect of DSP in the absence of DTT (Figs. 2A, C, E, G, 3A, C, D). The improved detection of endogenous α -synuclein obtained with DSP/DTT was not significantly enhanced further by additional treatments of the membranes with PFA (data not shown).

In the absence of DSP, all tested antibodies detected a predominant 60-kDa immunoreactive band (Figs. 2A, C, E, G, 3A, C, D). Treatment with DSP and DTT induced a decrease in the immunoreactivity of this 60-kDa band together with a corresponding increase in the levels of 15-kDa monomeric α -synuclein (Figs. 2A, C, E, G, 3A, C, D). Such a pattern observed after *in vitro* cross-linking is consistent with the existence of tetrameric α -synuclein in the ENS, as already reported in central nervous system neurons [18].

DISCUSSION

Here we show that the immunodetection of endogenous α -synuclein in the ENS is improved when methods for enhanced membrane retention of the protein, such as incubation of the membranes with PFA or treatment of the samples with DSP, are applied [17, 18]. As already reported [18], these two retention methods were not additional, as the combined use of PFA and

DSP did not improve immunodetection beyond the effect of DSP alone. Nevertheless, our results strongly suggest that incubating blot membrane in PFA is less effective than treating the samples with the cross linker DSP for the detection of endogenous α -synuclein in enteric neurons. While Syn-1 and (C20)-R signals in gut samples were increased with PFA, LB509 and Syn211, two other widely used α -synuclein antibodies, failed to detect α -synuclein in the ENS when associated with this retention membrane method. By contrast, the 15-kDa monomeric α -synuclein signal obtained in gut samples using all four total α -synuclein antibodies was markedly enhanced when samples were treated with DSP and β -mercaptoethanol. When it comes to phosphorylated α -synuclein, the difference in effectiveness between the two methods is even more striking, as DSP was the only method capable of detecting monomeric α -synuclein phosphorylated at serine 129 not only in gut but also in brain. These results are in accordance with a recent survey, which reported that PFA fixation in Western blotting using EP1536Y antibody facilitated the visualization of signals for endogenous phosphorylated α -synuclein monomers in neuronal cell lines, but not in brain [22].

As a whole, our results demonstrate that the detection of total and phosphorylated α -synuclein can be markedly increased in the gut, which express low level of the protein. As an optimized protocol, we suggest that gut homogenates should be treated with 2.5 mM DSP and that the immunoblot should be performed with (C20)-R antibodies for the detection of total α -synuclein and either p- α -syn, EP1536Y or pSyn#64 for the detection of the phosphorylated form of the protein. Such an optimized protocol opens the way to the development of new and original biomarkers for PD that will enable a quantification of pathological α -synuclein, either aggregated and/or phosphorylated in gastrointestinal biopsies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from *centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens* (CECAP) to PD. GB is supported by a Master's grant of DHU2020. AGC is a recipient of a *poste d'accueil Inserm*.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no actual or potential conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, & Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840.
- [2] Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, & Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*, **4**, 160-164.
- [3] Beach TG, White CL, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, Leverenz JB, Roncaroli F, Buttni M, Hladik CL, Sue LI, Noorigian JV, & Adler CH (2008) Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol*, **116**, 277-288.
- [4] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, & Walker DG (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, **119**, 689-702.
- [5] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, & Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 197-211.
- [6] Leboviciu T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & Derkinderen P (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*, **22**, e11-e14.
- [7] Derkinderen P, Rouaud T, Leboviciu T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & De Giorgio R (2011) Parkinson disease: The enteric nervous system spills its guts. *Neurology*, **77**, 1761-1767.
- [8] Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A, Zorenkov D, Deuschl G, Wedel T (2015) Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol*, doi: 10.1111/ene.12753
- [9] Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, & Kordower JH (2012) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*, **27**, 709-715.
- [10] Visanji NP, Marras C, Kern DS, Dakheel AI A, Gao A, Liu LWC, Lang AE, & Hazrati L-N (2015) Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology*, **84**, 609-616.
- [11] Leboviciu T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, Nguyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flament M, Galmiche JP, Damier P, & Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*, **5**, e12728.
- [12] Gray MT, Munoz DG, Gray DA, Schlossmacher MG, & Woulfe JM (2014) Alpha-synuclein in the appendiceal mucosa of neurologically intact subjects. *Mov Disord*, **29**, 991-998.
- [13] Gold A, Turkalp ZT, & Munoz DG (2013) Enteric alpha-synuclein expression is increased in Parkinson's disease but not Alzheimer's disease. *Mov Disord*, **28**, 237-240.
- [14] Sánchez-Ferro Á, Rábano A, Catalán MJ, Rodríguez-Valcárcel FC, Fernández Díez S, Herreros-Rodríguez J, García-Cobos E, Álvarez-Santullano MM, López-Manzanera L, Mosqueira AJ, Vela Desoja L, López-Lozano JJ, López-Valdés E, Sánchez-Sánchez R, & Molina-Arjona JA (2015) *In vivo* gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord*, **30**, 517-524.
- [15] Böttner M, Zorenkov D, Hellwig I, Barrenschee M, Harde J, Fricke T, Deuschl G, Egberts J-H, Becker T, Fritscher-Ravens

- A, Arlt A, & Wedel T (2012) Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol Dis*, **48**, 474-480.
- [16] Böttner M, Fricke T, Müller M, Barrenschee M, Deuschl G, Schneider SA, Egberts J-H, Becker T, Fritscher-Ravens A, Ellrichmann M, Schulz-Schaeffer WJ, & Wedel T (2015) Alpha-synuclein is associated with the synaptic vesicle apparatus in the human and rat enteric nervous system. *Brain Res*, **1614**, 51-59.
- [17] Lee BR, & Kamitani T (2011) Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. *PLoS One*, **6**, e23939.
- [18] Newman AJ, Selkoe D, & Dettmer U (2013) A new method for quantitative immunoblotting of endogenous α -synuclein. *PLoS One*, **8**, e81314.
- [19] Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, & Neunlist M (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol*, **586**, 1963-1975.
- [20] Hoffman WL, Jump AA, & Ruggles AO (1994) Soaking nitrocellulose blots in acidic buffers improves the detection of bound antibodies without loss of biological activity. *Anal Biochem*, **217**, 153-155.
- [21] Derkinderen P, & Girault J-A (1996) *Protein Tyrosine Phosphorylation*, Humana Press, New Jersey, **30** 251-274.
- [22] Sasaki A, Arawaka S, Sato H, & Kato T (2015) Sensitive western blotting for detection of endogenous Ser129-phosphorylated α -synuclein in intracellular and extracellular spaces. *Sci Rep*, **5**, 14211.

2.2.2 Quantification et caractérisation biochimique de l'α-synucléine dans le SNE en conditions physiologiques et dans la MP

(Données non publiées)

Contexte

Déterminer si la présence de l'α-synucléine dans les biopsies gastro-intestinales peut composer un biomarqueur précoce de la MP est un challenge actuel. De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens, principalement basés sur une approche de détection immunohistochimique de l'α-synucléine entérique. Compte-tenu des résultats parfois contradictoires des études et des difficultés techniques de la détection de la STL par IHC, l'utilisation de méthodes biochimiques sensibles pour quantifier et identifier les formes pathologiques de l'α-synucléine (agrégées et/ou phosphorylées) permettrait une interprétation objective et quantifiable des résultats et une standardisation de la technique.

Ayant optimisé le protocole de western blot pour détecter l'α-synucléine entérique, nous avons donc cherché à quantifier par western blot l'expression de l'α synucléine totale et de sa forme phosphorylée sur la sérine 129 dans les biopsies coliques de sujets témoins et parkinsoniens. Dans un second temps nous avons cherché à identifier ses modifications post-traductionnelles par électrophorèse bidimensionnelle.

Méthodes

Des biopsies coliques de 8 patients témoins et de 8 patients parkinsoniens, qui ont été immédiatement plongées dans l'azote liquide juste après le prélèvement puis conservées à sec à -80° lors des études Entéropark ou Synapark, ont été utilisées pour cette étude. Un échantillon de cortex cérébral d'un patient atteint de démence à corps de Lewy a été fourni par la biocollection de recherche du CHU d'Angers.

Pour l'analyse en western blot chaque biopsie ou échantillon de cortex cérébral a été lysée dans 300μl le tampon de lyse NETF (100 mM NaCl - 2 mM EDTA - 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 - 50 mM NaF - 1% (v/v) Nonidet P-40 (Roche Life Science) comprenant un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (inhibiteur cocktail 3, Sigma) et un inhibiteur de Protéase (Complete EDTA free,

Roche), homogénéisée dans un tube à billes à l'aide de Précellys. Le lysat a été soniqué, puis centrifugé 20 minutes à 16 000g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le dosage des protéines a été fait selon la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay, Pierce) au moyen d'un spectrophotomètre (Varioskan™).

Western blot et cross linking *in vitro*:

Après normalisation de la quantité protéique des échantillons, le cross-linking *in vitro* a été réalisé selon la procédure décrite dans l'article précédent (Preterre et al., 2015). Les homogénats protéiques ont été traités pendant 30 minutes à 37° avec agitation douce (environ 100 RPM ?) avec du DSP (Pierce, Thermo) utilisé à 1mM à partir d'une solution stock fraîchement préparée à 25mM dans du DMSO. Le cross-linking a été arrêté par l'ajout de Tris-HCl 1 M, pH 7.6 à une concentration finale de 50 mM pendant 15 minutes à température ambiante. Les lysats ont ensuite été préparés pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes, en utilisant le tampon de charge Nupage en présence de DTT Nupage (Life Technology) puis chauffés à 70°C pendant 10 minutes. Les échantillons ont été déposés pour migration électrophorétique sur gels de polyacrylamide avec gradient 4-12% Bis-Tris (Life technologies, Saint-Aubin, France) puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Les étapes de la suite du western blot ont déjà été décrites dans la partie méthode de l'article précédent. Les anticorps primaires utilisés ont été l'anti-synucléine totale C20R (Santa Cruz) (1 :1000) et l'anti-P-Ser129-anti-synucléine (Wako) (1 :500). La comparaison entre les groupes témoins et parkinsoniens a été faite par un test t non paramétrique.

Electrophorèse bidimensionnelle

Pour ce travail, des biopsies coliques, des échantillons de colon transmurale issu de pièce opératoire de colectomie à distance d'un cancer colique chez une patiente indemne de pathologie neurodégénérative, de cortex temporal issu d'un cerveau sain et d'un patient atteint de DCL ont été utilisées. Les échantillons de même poids ont été lysés dans un même volume de tampon UTC contenant 60mM de DTT, puis ont été, puis préparés pour l'électrophorèse bidimensionnelle selon le protocole recommandé pour les gels Zoom (Life technologies). Des gels Zoom 4-12% Bis-Tris ont été utilisés avec des strips IPG Zoom pH 4-7 ou 3-10 non linéaires.

Après migration les protéines du gel ont été transférées sur des membranes PVDF et fixées avec incubation au PFA 30 minutes qui avait montré une efficacité pour améliorer la détection de l' α synucléine entérique. Le reste de la procédure est la même que celle décrite pour la partie western blot. Les anticorps primaires utilisés ont été soit l'anti- α -synucléine (C20)-R (sc-7011-R, Santa Cruz Biotechnology) ou le Syn-1 (BD).

Résultats

Données démographiques

Les 8 témoins et les 8 parkinsoniens n'avaient pas de différence d'âge ou de sexe ratio.

Expression de l' α -synucléine totale par Western blot dans les biopsies coliques dans la MP

Comme illustré Figure 15, on a pu observer que malgré l'utilisation du cross linker réductible l' α synucléine est inconstamment mise en évidence dans les biopsies. De même pour la protéine neuronale PGP9.5 qui n'est quasi pas détectable pour 2 des 16 biopsies testées. Ainsi je n'ai pu quantifier l'expression que dans les biopsies ayant des valeurs de signal supérieures au bruit de fond, soit seulement les biopsies de 6 témoins et de 3 parkinsoniens. Le taux d'expression de l' α -synucléine totale rapportée au taux de la protéine neuronale PGP9.5 dans les biopsies coliques n'était pas différent entre les sujets témoins et parkinsoniens (moyennes géométriques par rapport à la moyenne des témoins de 170% et de 152% respectivement). Le signal révélé en utilisant l'anticorps anti-P-Ser129- α -synucléine était trop faible pour permettre une quantification de la forme phosphorylée dans les biopsies coliques.

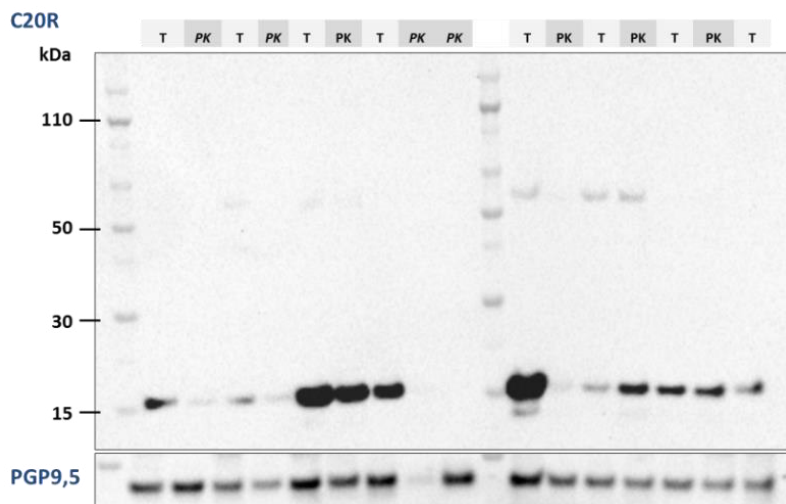


Figure 15. Illustration du western blot de l' α -synucléine totale révélée par l'anticorps C20R dans les biopsies coliques de patients témoins (T) et de parkinsoniens (PK) (n=8). En italique les biopsies pour lesquelles la quantification n'a pas pu être faite.

Comparaison du profil de migration en électrophorèse bidimensionnelle de l' α -synucléine entre le colon et le cerveau chez l'homme

L'électrophorèse bidimensionnelle de l'échantillon de cortex de patient DLB met en évidence après révélation par un anticorps dirigé contre l' α -synucléine totale (que ce soit Syn-1 ou (C20)-R) un signal prépondérant correspondant à la migration standard de la synucléine autour de 14kDa pH isoélectrique de 4,6, mais également des formes de plus hauts poids moléculaires (PM) déjà décrits dans la littérature comme correspondant aux formes agrégées contenues dans les corps de Lewy (Anderson et al., 2006). En effet comme illustrées dans la figure 16 ces formes de hauts PM n'ont pas été retrouvées dans le cortex cérébral ni dans le colon issus de sujets indemnes de pathologie neurodégénérative. L' α synucléine totale révélée par l'anticorps (C20)-R a été analysée en électrophorèse 2D dans les biopsies coliques de 4 témoins et de 8 parkinsoniens. L' α synucléine y était qu'inconstamment détectée et lorsque présente, les formes de hauts PM n'ont jamais été mises en évidence.

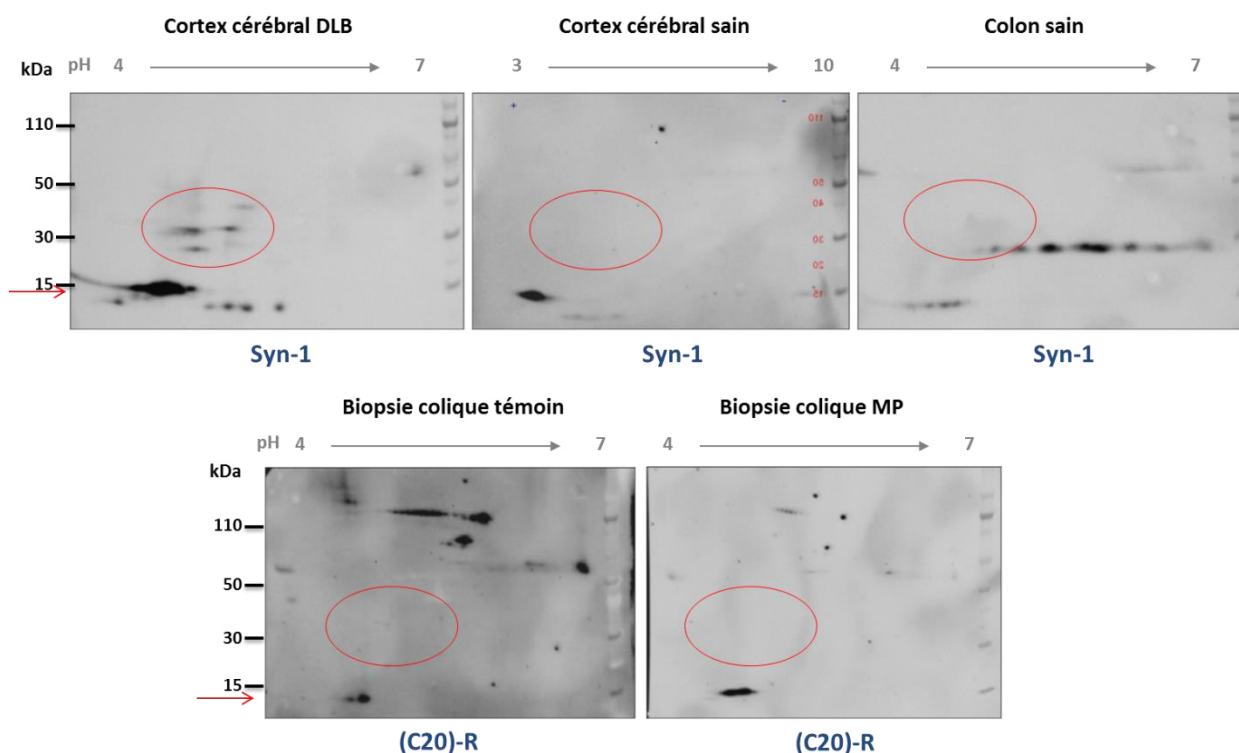


Figure 16. Electrophorèse bidimensionnelle dans différents tissus, utilisant des anticorps dirigés contre l' α -synucléine totale (Syn-1 en haut et (C20)-R en bas). Noter la présence d' α -synucléine monomérique aux alentours de 14kDa (flèche) et la présence des formes de plus hauts PM (cercle rouge) uniquement dans le cortex cérébral d'un patient atteint de DCL (=DLB).

Discussion

L'analyse biochimique de l' α -synucléine entérique totale ou phosphorylée est possible mais limitée par la faible quantité de tissu neuronal et d' α -synucléine contenus dans les biopsies. Les analyses quantitatives n'ont pu être réalisées que sur un nombre faible de biopsies et ne semblent pas montrer d'augmentation de l'expression de la forme totale de l' α -synucléine dans les biopsies coliques de la MP. De même l'analyse qualitative par électrophorèse 2D de l' α -synucléine n'a pas permis de mettre en évidence dans les biopsies coliques de patients les formes pathologiques présentes dans les corps de Lewy. Il s'agit ici de résultats encore préliminaires. Ces résultats, bien que non contradictoires, sont à l'encontre des données existantes obtenues en IHC, suggérant une augmentation de l'expression tissulaire et un aspect IHC de type corps de Lewy.

Afin d'avancer dans l'analyse biochimique de la STL il pourrait être utiles d'enrichir le lysat en α -synucléine (immunoprécipitation, fractionnement cellulaire), voire en α -synucléine agrégée (dot blot, filter trap). Enfin des techniques de détection encore plus sensibles (amplification par amorce) seraient utiles pour visualiser de potentiels dépôts pathologiques d' α -synucléine dans les biopsies gastro-intestinales.

3 L' α -synucléine entérique physiologique existe-t-elle sous forme tétramérique ?

Résumé des résultats publiés dans Journal of Neurochemistry (accepté, in press)

ARTICLE 5. Cross-linking for the analysis of α -synuclein in the enteric nervous system

Anne-Gaëlle Corbillé, Michel Neunlist and Pascal Derkinderen

Suite à l'observation que l' α -synucléine agrégée, caractéristique pathologique de la MP, se trouve dans le tube digestif chez presque tous les patients, il a été suggéré que le système nerveux entérique (SNE) pourrait constituer un point de départ de l' α -synucléine pathologique. L' α -synucléine a été longtemps considérée comme étant sous forme monomérique dans les cellules vivantes, mais des études récentes suggèrent qu'elle existerait aussi sous forme de tétramères instables dans des cellules non neuronales et dans les neurones, et qu'un ratio tétramère/monomère augmenté pourrait faciliter la survenue de la fibrillation de l' α -synucléine. Compte tenu du potentiel rôle clé du SNE dans la physiopathologie de la MP, nous avons entrepris l'étude actuelle pour caractériser l'état natif de l' α -synucléine dans des cultures primaires de SNE de rat et dans le SNE humain adulte. En utilisant un « cross-linker » réactif avec les amines, nous avons montré que, contrairement à des lignées cellulaires et les neurones du cerveau, l' α -synucléine existe principalement sous forme de monomère dans les neurones entériques intacts, suggérant que l'état natif de l' α -synucléine est différent entre l'ENS et cerveau. Nos résultats fournissent de nouveaux éléments sur les concepts largement discutés du misfolding et de l'agrégation α -synucléine dans la MP et de la question au sujet de la transmission éventuelle de l' α -synucléine du SNE au cerveau.



Cross-linking for the analysis of α -synuclein in the enteric nervous system

Journal:	<i>Journal of Neurochemistry</i>
Manuscript ID:	JNC-2016-0468.R2
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	06-Sep-2016
Complete List of Authors:	Corbillé, Anne-Gaëlle; Inserm U913 Neunlist, Michel; INSERM U539, Derkinderen, Pascal; Inserm U913, CHU Nantes
Area/Section:	Molecular Basis of Disease
Keywords:	enteric nervous system; alpha-synuclein; Parkinson's disease; cross-linking.

SCHOLARONE™
Manuscripts

view

Cross-linking for the analysis of α -synuclein in the enteric nervous system

Anne-Gaëlle Corbillé^{a, b, c}, Michel Neunlist^{a, b} and Pascal Derkinderen^{a, b, c}

^aInserm, U913, Nantes, F-44035, France

^bNantes University, Nantes, F-44035, France

^cCHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, F-44093, France

Corresponding author: Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1, rue Gaston Veil, 44035

Nantes Cedex 1 France. derkinderenp@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Keywords: enteric nervous system; α -synuclein; Parkinson's disease; cross-linking.

Abstract

Since the observation that aggregated alpha-synuclein, the pathological hallmark of Parkinson's disease (PD), is found in the gut in almost all patients, it has been suggested that the enteric nervous system (ENS) could be a starting point for alpha-synuclein pathology. Alpha-synuclein has long been thought to occur as a monomer in living cells, but recent studies reported that it instead exists as a tetramer in non-neuronal cells and in neurons. Given the possible key role of the ENS in PD pathophysiology, we undertook the current research to characterize the native state of alpha-synuclein in rat primary culture of ENS and in adult human healthy ENS. Using amine-reactive cross-linking, we showed that, by contrast to cell lines and brain neurons, alpha-synuclein exists primarily as a monomer in intact enteric neurons, suggesting that the native state of alpha-synuclein is different between the ENS and the brain. Our results provide new insights into the widely discussed concepts of alpha-synuclein aggregation and misfolding in PD and raise issue about the possible transmission of alpha-synuclein from the ENS to the brain.

Introduction

Alpha-synuclein, a 140-amino acid neuronal protein, has attracted great interest since 1997 after a mutation in its gene was identified in autosomal dominant Parkinson's disease (PD), and its aggregates were found to be the primary components of Lewy bodies and neurites (together referred to as Lewy pathology), the pathological hallmarks of PD (Polymeropoulos *et al.* 1997; Spillantini *et al.* 1997). Since then, many studies have focused on the biochemical characterization of alpha-synuclein in the brain and in neurons from the central nervous system (CNS). There is still open debate about the physiological structure of brain alpha-synuclein as two research groups came to the conclusion that it occurs as a helically folded tetramer (Wang *et al.* 2011; Bartels *et al.* 2011), while others counterclaim that it exists primarily as a disordered monomer (Fauvet *et al.* 2012).

It is now evident that PD is a multicentric neurodegenerative disorder that affects several peripheral autonomic neuronal structures outside the central nervous system, among which is the enteric nervous system (ENS). Detailed autopsy studies indeed showed that Lewy pathology was found in ENS in nearly every case examined pathologically (Beach *et al.* 2009; Gelpi *et al.* 2014). These findings prompted a substantial amount of research on the detection of aggregated and/or phosphorylated alpha-synuclein using endoscopically obtained gastrointestinal biopsies in order to achieve *in vivo* pathological diagnosis of PD (Lebouvier *et al.* 2008; Lebouvier *et al.* 2010b; Pouclet *et al.* 2012; Shannon *et al.* 2012; Visanji *et al.* 2014; Chung *et al.* 2015; Corbillé *et al.* 2016b; Hilton *et al.* 2013). In spite of the increasing interest in the ENS as a potential source of biomarker for PD, only few studies explored the expression pattern of alpha-synuclein in the healthy human ENS (Böttner *et al.* 2012) and there are no

1
2
3 existing data comparing the biochemical characteristics of alpha-synuclein between the
4
5 ENS and CNS (Preterre *et al.* 2015). Several reports from Selkoe's group showed that the
6
7 use of amine cross-linkers such as DSP (dithiobis(succinimidyl propionate)) and DSG
8
9 (disuccinimidyl glutarate) improved the detection by Western blot of both monomeric
10
11 and multimeric forms of alpha-synuclein in brain tissues, in primary CNS neurons and in
12
13 human erythroid leukemia (HEL) cells (Newman *et al.* 2013; Dettmer *et al.* 2013;
14
15 Dettmer *et al.* 2015). We have recently shown that such an approach also facilitated the
16
17 detection of monomeric alpha-synuclein in human gut samples (Preterre *et al.* 2015). In
18
19 the current study, we took advantage of this cross-linking method to compare the
20
21 biochemical characteristics of alpha-synuclein between primary culture of ENS and HEL
22
23 cells and between adult human brain and healthy human small intestine.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Material and Methods

Human tissues

Samples of frozen temporal cortex from two post-mortem human brains devoid of neurodegeneration were obtained from the Neuropathology Department of Angers (Dr Franck Letournel). Specimens of human small intestine (ileum) and colon were obtained from two neurologically unimpaired subjects who underwent intestinal and colon resection for volvulus and colorectal cancer, respectively. For both tissue specimens, sampling was performed in macroscopically normal segments of uninvolved resection margins. The sampling of the human brain and small intestine was approved by the *Fédération des biothèques* of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human, and registered under the no. DC-2008-402. Written informed consent was obtained from the 2 subjects who underwent intestinal and colon resection.

HEL cells and primary culture of rat ENS

Human erythroid leukemia cells (HEL; ATCC number TIB-180, LGC Standards, Molsheim, France) were cultured in RPMI 1640 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Sigma) at densities from 0.2 to 1.5.10⁶ cells/ml. Primary culture of rat ENS was generated and cultured as previously described (Chevalier *et al.* 2008).

Intact cell cross-linking of cultured cells.

Disuccinimidyl glutarate (DSG), and dithiobis(succinimidyl) propionate (DSP) were purchased from Thermofisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). Both cross-linkers were dissolved in DMSO at 25X final concentration.

1
2
3 For cross-linking in HEL cells, cells were washed once with phosphate-buffered
4 saline (PBS: 50 mM potassium phosphate; 150 mM NaCl; pH 7.2), collected by trituration
5 and resuspended in 100 μ l of Tris-buffered saline (TBS: 100 mM NaCl, 10 mM Tris; pH
6 7.5) with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche, Neuilly sur Seine, France)
7 (Figure 1A). DSP and DSG were then added to the cell suspension to obtain the desired
8 final concentration and incubated for 30 min at 37°C with rotation (Figure 1A). Controls
9 were treated with an equivalent volume of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma). The
10 reaction was quenched with the addition of 1 M Tris, pH 7.6 to 50 mM final
11 concentration and incubated for 15 min at room temperature (21°C). After quenching,
12 proteins were extracted (see below). Primary culture of ENS were processed similarly
13 except for the treatment with DSP/DSG, which was performed directly in the well plate
14 in 100 μ l of TBS with a protease inhibitor cocktail after a short PBS washing (Figure 1B).

31 32 *Intact cell cross-linking of human brain and gut tissues*

33
34 Samples of human brain and small intestine were finely minced with a razor blade
35 (Figure 1C). Minced samples were transferred to 15 ml tubes containing 5 ml of TBS
36 with protease inhibitors and the solution was resuspended by gentle shaking. Aliquots
37 were transferred to 1.5 ml tubes and spun at 1,000 g for 5 minutes at room temperature
38 (21°C). Supernatants were discarded, and the pellets (intact tissue samples) were
39 resuspended and used for crosslinking. DSP and DSG were added to the minced samples
40 suspension to obtain the desired final concentration and incubated for 30 min at 37°C
41 with rotation (Figure 1C). After quenching, proteins were extracted (see below).
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Preparation of alpha-synuclein oligomers and treatment with DSP

Lyophilized recombinant alpha-synuclein (Millipore, Molsheim, France) was dissolved in PBS at a concentration of 10 mg/mL. Oligomer formation was induced through incubation at 37°C for one week as described previously (Zhang *et al.* 2005). Preparations were aliquoted and kept frozen until further use. Monomeric or oligomeric alpha-synuclein at a concentration of 10 µg/µl in PBS with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) were treated with a range of DSP concentrations for 30 minutes at 37°C.

Electrophoresis and immunoblotting

Total protein concentrations were determined by BCA assay (Thermo Scientific) using Varioskan™ (Thermo Scientific). Samples were further prepared for electrophoresis by diluting with NuPAGE sample buffer with or without reducing agent, then heated at 70°C for 10 min. Lysates were separated using the NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Life technologies, Saint-Aubin, France) together with the 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate (MES-SDS) running buffer before electrophoretic transfer to PVDF membranes with the iBlot™ Dry Blotting System also from Life technologies. Membranes were then blocked for one hour at room temperature in TBS with 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal alpha-synuclein (C20)-R (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany, 1:1000), mouse monoclonal alpha-synuclein Syn-1 (BD Bioscience, Le pont de Claix, France, 1:1000), mouse monoclonal alpha-synuclein Syn-211 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) and rabbit polyclonal DJ-1 (ab18257, Abcam, Paris, France, 1:1000). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Life technologies, diluted 1:

5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (Clarity ECL, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). To confirm equal protein loading, membranes were incubated in stripping buffer containing 500mM Tris-HCl with 0.1M β -mercaptoethanol and 2% (v/v) sodium dodecyl sulfate for 20 min at 60°C, followed by extensive washing in TBS before reblocking for 30 min in TBS with 5% non-fat dry milk and reprobing with mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma, 1:5000). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Life technologies, diluted 1: 5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (Clarity ECL, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). When relevant, the multimer/monomer ratio was evaluated by measuring the density of the immunoreactive bands with laser-scanning densitometry and NIH Image J software.

Results

Intact cells cross-linking shows that endogenous alpha-synuclein species are different between HEL cells and primary culture of ENS

To define the assembly state of endogenous alpha-synuclein in living cells and tissues, we used the two membrane permeable amine-reactive cross-linkers DSP and DSG. DSP has a spacer arm length of 12 Å and is cleavable by reducing agents such as Dithiothreitol (DTT) and β -mercaptoethanol while DSG has a shorter spacer length of 7.7 Å, which is resistant to reducing agents (Figure 2A). These two compounds have been previously successfully used at 1 mM by Dettmer *et al.* to analyze the assembly state of alpha-synuclein in a variety of cell types including HEL cells and primary CNS culture (Dettmer *et al.* 2013). For the detection of alpha-synuclein, we used the two well-characterized antibodies (C20)-R and Syn-1 as these two antibodies efficiently detect monomeric alpha-synuclein in enteric neurons and are also appropriate for the

1
2
3 detection of the cross-linked multimers in HEL and neuronal cells (Preterre *et al.* 2015;
4
5 Dettmer *et al.* 2013) (Figure 2B). An additional antibody, Syn-211, was used in some
6
7 experiments with brain and gut samples (Figure 2B). To obtain a migration pattern of
8
9 multimeric alpha-synuclein that could be useful for the interpretation of our cross
10
11 linking experiments, these 3 antibodies were tested against alpha-synuclein oligomers
12
13 subjected or not to *in vitro* treatment with DSP. In the absence of DSP, monomeric and
14
15 oligomeric forms of alpha-synuclein were detected only following long exposure times
16
17 of the (C20)-R immunoblots (Figure 2C). When DSP was added to the preparation of
18
19 aggregated alpha-synuclein, monomeric as well as oligomeric (dimer, trimer, quadrimer
20
21 and pentamer) forms of the protein became easily visible with (C20)-R and Syn-211
22
23 antibodies (Figure 2C). No changes in the amount of monomeric and oligomeric alpha-
24
25 synuclein were observed when the reducing agent DTT was added to DSP and the
26
27 oligomer/monomer ratio was unchanged with DSP concentration ranging from 0.1 to 1
28
29 mM (Figure 2C and supplementary Figure 1). Altogether, these results strongly suggest
30
31 that the primary effect of DSP in these experiments was not to promote alpha-synuclein
32
33 oligomerization but rather to increase alpha-synuclein immunodetection by enhancing
34
35 retention of the protein on blot membranes (Newman *et al.* 2013; Preterre *et al.* 2015).
36
37 By contrast to (C20)-R and Syn-211, no alpha-synuclein immunoreactive bands were
38
39 visualized either at the monomer or oligomer level when Syn-1 was used for
40
41 immunoblotting (Figure 2C). This is consistent with our previous finding (Preterre *et al.*
42
43 2015) and suggests that amine cross-linkers sterically hamper access to the 9 amino
44
45 acids epitope of Syn-1 (Perrin *et al.* 2003) by binding to the 2 lysine residues located at
46
47 position 96 and 97 (Figure 2B).
48
49
50
51
52
53

54
55 In a first set of experiments, we used DSP and DSG to compare the assembly state
56
57 of alpha-synuclein between living HEL cells and primary ENS culture. We tested
58
59
60

1
2
3 concentration gradients of 0.5, 1.0 and 2.0 mM of DSG and 1.0 and 2.0 mM of DSP vs
4
5 vehicle alone (DMSO), in the absence or the presence of reducing agent DTT. DJ-1, which
6
7 is known to exist endogenously as dimers in cells, was used as a control protein (Baulac
8
9 *et al.* 2004). Application of each of the two cross-linkers induced a dose-dependent
10
11 increase in the dimeric form of DJ-1 along with a corresponding decrease in the levels of
12
13 monomer, thereby confirming the general effectiveness of these compounds in HEL cells
14
15 and primary ENS culture (Figure 3A and B). The specificity of the cross-linking was
16
17 supported by the fact that DJ-1 dimer reverted to monomer, when the reducible cross-
18
19 linker DSP was cleaved with DTT (Figure 3B). A slight but noticeable increase in the
20
21 immunoreactivity of both DJ-1 dimer and monomer was observed in samples treated
22
23 with DSG and DTT as compared to samples treated with DSG alone (Figure 3A and B).
24
25 This is likely due to the fact that DTT optimizes protein detection and migration in
26
27 Western blot by denaturing and removing all higher order structures of the proteins.
28
29
30
31

32
33 The application of the cross-linker DSG in HEL cells induced a dose-dependent
34
35 increase in the immunoreactivity of a 60-kDa migrating band with either (C20)-R and
36
37 Syn-1 antibodies (indicated as 4-mer in Figure 3C and E). Additional fainter α -
38
39 synuclein immunoreactive bands at 80 and 100 kDa were also observed with the two
40
41 tested antibodies in the presence of DSG (Figure 3C and E). Regarding the 15-kDa
42
43 monomeric α -synuclein, a dose-dependent increase in its immunoreactivity was
44
45 observed with (C20)-R (Figure 3C) while DSG at 2 mM resulted in a marked decrease in
46
47 monomer immunoreactivity when Syn-1 was used (Figure 3E), as already observed in
48
49 Figure 1C and in our previous report (Preterre *et al.* 2015).
50
51
52

53
54 Treatment of primary culture of ENS with 0.5, 1.0 and 2.0 mM DSG resulted in an
55
56 increase in monomeric α -synuclein signal that plateaued at 1 mM for the two
57
58 antibodies (Figure 3D and F). By striking contrast to HEL cells, no specific additional
59
60

bands (especially higher molecular weight species with a size range of 60-100 kDa) were observed in enteric cells treated with DSG when compared to cells treated with DMSO alone (Figure 3D and F). Likewise, besides the free monomer, no specific slower migrating bands were observed with (C20)-R and Syn-1 when cells were pretreated with the reducible cross-linker DSP at 1.0 and 2.0 mM without DTT versus DMSO alone (Figure 3D and F). Addition of DTT to DSP induced a marked increase in the alpha-synuclein monomer signal (Figure 3D and F), consistent with previous findings showing that such a pretreatment promotes alpha-synuclein retention to blotting membranes thereby facilitating its detection (Dettmer *et al.* 2013; Preterre *et al.* 2015). Worthy of note was the presence of the known non-specific band at 50 kDa in all Western blots performed with Syn-1 (Figure 3E and F) (Perrin *et al.* 2003; Dettmer *et al.* 2013; Preterre *et al.* 2015).

Collectively our results show that the pattern of alpha-synuclein immunoreactivity in the presence of cross-linkers is strikingly different between living HEL cells and enteric neurons. The results we have obtained in HEL cells are consistent with the previous observation by Dettmer *et al.*, which showed that a notable proportion of native alpha-synuclein in HEL cells is tetrameric (Dettmer *et al.* 2013). In sharp contrast, we did not find evidence of tetramer of alpha-synuclein in primary culture of ENS and detected only monomeric form even in the presence of cross-linkers.

Intact cells cross-linking shows that endogenous alpha-synuclein species are different between human brain and human small intestine

In a second set of experiments, we used DSP and DSG to compare the assembly state of alpha-synuclein between human brain and human small intestine and colon. We tested two concentrations of DSG (0.5 and 2.0 mM) and 1.0 mM DSP in the presence of DTT. As

described above for the assessment in living HEL cells and enteric neurons, the efficiency and the specificity of the cross-linking were confirmed by evaluating DJ-1 cross-linking as a dimer (Figure 4A). Treatment of brain bits with 0.5 and 2.0 mM DSG induced the appearance of two (C20)-R immunoreactive bands at ~35 and 90 kDa. Based on the migration pattern of recombinant alpha-synuclein, these 35 and 90 kDa immunoreactive bands most likely represent dimers and pentamers of alpha-synuclein, respectively (indicated as 2- and 5-mer in Figure 4B). Nevertheless, because tissue derived protein may not have the same sizing as recombinant alpha-synuclein, we cannot exclude that these two additional bands are in fact alpha-synuclein with post-translational modifications. The 90-kDa band was also observed with Syn-1 (Figure 4C), while Syn-211 also detected the dimer band at ~35 kDa (Figure 4D). These two bands disappeared when DSP cross-linking was reverted with DTT (Figure 4B, C and D). Both DSG and DSP induced an increase in the immunoreactivity of the 15-kDa monomeric alpha-synuclein in brain samples when (C20)-R and Syn-211 antibodies were used (Figure 4B and D). Regarding the small intestine, antiserum (C20)-R detected the expected monomeric alpha-synuclein, a detection that was only moderately facilitated in the presence of 0.5 and 1mM DSG when compared to DMSO alone (Figure 4B). A strong increase in monomeric alpha-synuclein signal occurred when 1mM DSP/DTT was added (Figure 4B). An additional 160-kDa migrating band was also observed with (C20)-R in the presence of DSG (indicated as a white arrow in Figure 4B). The pattern of alpha-synuclein immunoreactivity in gut samples observed with Syn-1 was strikingly similar to that of Syn-211 (Figure 4 C and D). The monomeric form of alpha-synuclein was only detected when 1mM DSP/DTT was applied to human small intestine bits. These two antibodies also detected several additional slower migrating bands at ~30, 55, 80, 110 and 160 kDa (Figure 4C and D). Except for the 160-kDa band, most of them were likely

nonspecific as they were also observed in controls and did not disappear in the DSP/DTT condition (Figure 4C and D). A similar pattern of alpha-synuclein immunoreactivity was observed when samples from colon were analyzed (data not shown). In all brain and gut samples, beta-actin, which was used as a loading control, was not detectable when high concentrations (2.0 mM) of DSG were used (Figure 4 A-D). It is likely explained by the mono-link modifications of the lysine residues by the cross-linker that prevent the access of the antibody to the protein.

Taken together, these results show that the pattern of alpha-synuclein trapping following cross-linking is different between human brain and human small intestine. In samples from adult human brain, monomeric, dimeric and tetrameric species of alpha-synuclein were observed. When human small intestine bits were analyzed with the same *in vivo* cross-linking method, apart from the 160-kDa band, no specific high molecular weight species were observed, strongly suggesting that native alpha-synuclein occurs primarily as a monomer in enteric neurons.

Discussion

Our results show that the crosslinking pattern of endogenous alpha-synuclein in enteric neurons differs from that observed in central neurons and erythroid cells. They strongly suggests that the native state of alpha-synuclein is different between the ENS and the CNS.

The nature of the physiological structure of alpha-synuclein in mammalian cells is still intensely debated (Alderson and Bax 2016). The dispute ignited in 2011 when it was reported that, rather than being an unfolded monomer, alpha-synuclein exists primarily as a helical tetramer not only when heterologously expressed but also after purification from mammalian cells under non-denaturing conditions (Wang *et al.* 2011;

1
2
3 Bartels *et al.* 2011). However, subsequent attempts by other groups to confirm the
4
5 existence of helical tetramers have failed. Most of these initial results on the
6
7 physiological structure of alpha-synuclein have been obtained in cell lines, primary
8
9 culture of rat CNS neurons and rodent brains (Dettmer *et al.* 2013; Fauvet *et al.* 2012;
10
11 Burré *et al.* 2013). Nevertheless, as PD is not known to occur naturally in any species
12
13 other than humans, some of the leading research groups on alpha-synuclein biology also
14
15 carried out experiments in human brain tissues (Dettmer *et al.* 2015; Fauvet *et al.* 2012).
16
17 Dettmer *et al.* showed that alpha-synuclein was primarily detected as a tetramer in a
18
19 biopsy from normal human adult brain, thereby confirming their earlier findings
20
21 obtained in HEL cells and cultured neurons (Dettmer *et al.* 2015). By contrast, a
22
23 collaborative study performed by seven independent research groups showed that
24
25 alpha-synuclein obtained from autopsied human frontal cortex exists predominantly in
26
27 a monomeric state (Fauvet *et al.* 2012).
28
29
30
31

32 Comprehensive neuropathological studies have now clearly shown that PD
33
34 pathology is not limited to the brain but also affects the peripheral autonomic nervous
35
36 systems (Beach *et al.* 2009; Gelpi *et al.* 2014). Among these tissues, the ENS has garnered
37
38 much attention in recent years for several reasons: (i) autopsy studies consistently
39
40 showed that almost all PD patients display alpha-synuclein aggregates within their ENS
41
42 (Beach *et al.* 2009; Gelpi *et al.* 2014); (ii) Braak and colleagues have proposed that
43
44 alpha-synuclein aggregates appear in the ENS at the earliest stage of the disease, leading
45
46 to the assumption that PD pathology may originate in the gut (Braak *et al.* 2006); (iii)
47
48 the ENS, in contrast to the CNS, is accessible in living patients through routine biopsies
49
50 (Lebouvier *et al.* 2010a). As a whole, these specific features make the ENS a prime
51
52 candidate for being a window through which PD pathology can be assessed, and it is
53
54 therefore crucial to better characterize the native state of enteric alpha-synuclein in the
55
56
57
58
59
60

gut (Derkinderen *et al.* 2011; Corbillé *et al.* 2016a). Our results obtained in rat primary culture of ENS and in human intestine strongly suggest that in contrast to HEL cell lines and brain, alpha-synuclein occurs physiologically as a monomer in the ENS. We took advantage of the method developed by Dettmer *et al.* that enables to readily detect the apparent assembly state of alpha-synuclein in living cells to analyze enteric alpha-synuclein. In samples from adult human brain, we observed monomeric alpha-synuclein as well as high molecular weight species migrating at 35 and 90 kDa, likely representing dimer and pentamer of alpha-synuclein, respectively. It should however be noted that the estimated size of these 2 additional bands was based on the migration pattern of recombinant alpha-synuclein, which may differ from tissue-derived protein. In striking contrast to HEL cells and human brain, when primary culture of ENS and human gut samples were analyzed with the same *in vivo* cross-linking method, we observed consistently monomers of alpha-synuclein, which was accompanied, in some experiments, by a high molecular weight species migrating at 160 kDa. This strongly suggests that the native state of alpha-synuclein is different between the CNS and the ENS, this latter expressing primarily monomeric forms of the protein. These results are of particular interest regarding the pathophysiology and the development of PD. There is indeed growing evidence that supports the fact that misfolded and aggregated of alpha-synuclein is critically involved in the initiation and the spreading of the disease (reviewed in (Tyson *et al.* 2015)). It is suggested that misfolding or aggregation of alpha-synuclein might initially occur in the ENS as a result of some insult, environmental and/or genetic that might further spread to reach the CNS via the vagal preganglionic innervation of the gut. Alpha-synuclein expression in the ENS is restricted to a subset of enteric neurons that are synaptically linked with alpha-synuclein immunoreactive vagal neurons, thus providing a candidate alpha-synuclein-expressing pathway for the

retrograde transport of PD pathology (Phillips *et al.* 2008). The observation that the native state of alpha-synuclein seems to be different between gut and brain raises question about the possible spreading of pathological alpha-synuclein from the ENS to the CNS. In this context, it will be crucial to determine whether enteric and vagal neurons express or not the same native form of alpha-synuclein than brain neurons and whether pathological alpha-synuclein in the ENS is biochemically similar or not to the one present in Lewy bodies in the CNS.

Acknowledgements and sources of support

This work was supported by a Master's grant of DHU2020, a grant from *centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens* (CECAP) and from 'Parkinsoniens de Vendée'. AGC is a recipient of a *poste d'accueil Inserm*.

Conflict of interest

The authors declare no actual or potential conflict of interest.

Legend to figures

Figure 1. Schematic depicting the different protocols used for cross-linking in intact cells. (A) For cross-linking in HEL cells, cells were collected by trituration and resuspended before treatment with the cross-linker (for details see material and methods). **(B)** For primary culture of rat ENS, cross-linking was carried out in the well plate (for details see material and methods). **(C)** Intact cell cross-linking was performed after mincing the brain and gut samples with a razor blade (for details see material and methods)

Figure 2. Cross-linkers used in the current research and their effects on the immunodetection of recombinant alpha-synuclein oligomers by (C20)-R, Syn-1 and Syn-211 antibodies. (A) Chemical formula and main characteristics of the cross-linkers Disuccinimidyl glutarate (DSG) and dithiobis(succinimidyl) propionate (DSP). **(B)** Epitopes recognized by the different anti-synuclein antibodies Syn-1 (single underline); Syn-211 (dashed underline); the precise epitope recognized by (C-20)-R has not been characterized, but according to the manufacturer datasheet, it is directed against the C-terminus of the protein. Lysine residues, which are targeted by the two cross-linkers are highlighted in red. **(C)** Oligomeric alpha-synuclein was treated with 1.0 mM DSP or with vehicle alone (C) in the absence (-) or the presence (+) of the reducing agent DTT and analyzed (60 ng/well) by immunoblotting with (C20)-R, Syn-1 or Syn-211 antibodies. Short time and long time exposure of the (C20)-R immunoblots are shown. The position of the monomer/multimers (1-mer/2-, 3-, 4-, 5-mer) is indicated on the right.

Figure 3. Analysis of endogenous alpha-synuclein species in HEL cells and rat primary culture of ENS following cross-linking in intact cells. Intact HEL cells were treated with 0.5, 1.0 and 2.0 mM of DSG or with vehicle alone (DMSO, Control) in the absence (-) or the presence (+) of the reducing agent DTT and analyzed by immunoblotting with DJ-1 **(A)**, (C20)-R **(C)** or Syn-1 antibody **(E)**. Intact primary cultures of rat ENS were treated with 0.5, 1.0 and 2.0 mM of DSG or with vehicle alone (DMSO, Control), as well as with 1.0 and 2.0 mM of DSP, in the absence (-) or the presence (+) of the reducing agent DTT and analyzed by immunoblotting with DJ-1 **(B)**, (C20)-R **(D)**, or Syn-1 antibodies **(F)**. The position of the monomer/multimers (1-mer/2-, 4-mer) is indicated on the right and the 2-mer/1-mer as well as the 4-mer/1-mer ratios are

indicated under each lane. Results shown are representative of 3 independent experiments.

Figure 4. Analysis of endogenous alpha-synuclein species in adult human brain and small intestine following cross-linking in intact cells. Adult human brain and small intestine bits were minced and treated with 0.5 and 2.0 mM of DSG, 1 mM of DSP or with vehicle alone (DMSO, Control) in the presence of DTT. Samples were analyzed by immunoblotting with DJ-1 (A), (C20)-R (B), Syn-1 (C) and Syn-211 (D) antibodies. AS is for recombinant oligomeric alpha-synuclein. The position of the monomer/multimers (1-mer/2-, 5-mer) is indicated on the right and the 2-mer/1-mer as well as the 5-mer/1-mer ratios are indicated under each lane. The white arrow indicates the position of the 160 kDa band observed in small intestine samples. Results shown are representative of 2 independent experiments.

References

- Alderson T. R., Bax A. (2016) Parkinson's disease: Disorder in the court. *Nature* **530**, 38–39.
- Bartels T., Choi J. G., Selkoe D. J. (2011) α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **477**, 107–110.
- Baulac S., LaVoie M. J., Strahle J., Schlossmacher M. G., Xia W. (2004) Dimerization of Parkinson's disease-causing DJ-1 and formation of high molecular weight complexes in human brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 236–246.
- Beach T. G., Adler C. H., Sue L. I., Vedders L., Lue L., White III C. L., Akiyama H., et al. (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta neuropathologica* **119**, 689–702.

- Böttner M., Zorenkov D., Hellwig I., Barrenschee M., Harde J., Fricke T., Deuschl G., et al. (2012) Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol Dis* **48**, 474–480.
- Braak H., de Vos R. A., Bohl J., Del Tredici K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* **396**, 67–72.
- Burré J., Vivona S., Diao J., Sharma M., Brunger A. T., Südhof T. C. (2013) Properties of native brain α -synuclein. *Nature* **498**, E4–6– discussion E6–7.
- Chevalier J., Derkinderen P., Gomes P., Thinard R., Naveilhan P., Vanden Berghe P., Neunlist M. (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *The Journal of physiology* **586**, 1963–1975.
- Chung S. J., Kim J., Lee H. J., Ryu H.-S., Kim K., Lee J. H., Jung K. W., et al. (2016) Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord* **31**:241-9
- Corbillé A.-G., Clairembault T., Coron E., Leclair-Visonneau L., Preterre C., Neunlist M., Derkinderen P. (2016a) What a gastrointestinal biopsy can tell us about Parkinson's disease? *Neurogastroenterol Motil*. **28**:966-74
- Corbillé A.-G., Letournel F., Kordower J. H., Lee J., Shanes E., Neunlist M., Munoz D. G., Derkinderen P., Beach T. G. (2016b) Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 35.
- Derkinderen P., Rouaud T., Lebouvier T., Bruley des Varannes S., Neunlist M., De Giorgio R. (2011) Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology* **77**, 1761–1767.
- Dettmer U., Newman A. J., Luth E. S., Bartels T., Selkoe D. (2013) In vivo cross-linking

- reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells. *The Journal of biological chemistry* **288**, 6371–6385.
- Dettmer U., Newman A. J., Soldner F., Luth E. S., Kim N. C., Saucken von V. E., Sanderson J. B., Jaenisch R., Bartels T., Selkoe D. (2015) Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat Commun* **6**, 7314.
- Fauvet B., Mbefo M. K., Fares M.-B., Desobry C., Michael S., Ardah M. T., Tsika E., et al. (2012) α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *The Journal of biological chemistry* **287**, 15345–15364.
- Gelpi E., Navarro-Otano J., Tolosa E., Gaig C., Compta Y., Rey M. J., Martí M. J., et al. (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord.* **29**:1010-8.
- Hilton D., Stephens M., Kirk L., Edwards P., Potter R., Zajicek J., Broughton E., Hagan H., Carroll C. (2013) Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* **27**:235-41.
- Lebouvier T., Chaumette T., Damier P., Coron E., Toucheffeu Y., Vrignaud S., Naveilhan P., et al. (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* **57**, 1741–1743.
- Lebouvier T., Coron E., Chaumette T., Paillusson S., Bruley des Varannes S., Neunlist M., Derkinderen P. (2010a) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* **22**, e11–4.
- Lebouvier T., Neunlist M., Bruley des Varannes S., Coron E., Drouard A., Nguyen J. M., Chaumette T., et al. (2010b) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* **5**, e12728.

- Newman A. J., Selkoe D., Dettmer U. (2013) A new method for quantitative immunoblotting of endogenous α -synuclein. *PLoS One* **8**, e81314.
- Perrin R. J., Payton J. E., Barnett D. H., Wraight C. L., Woods W. S., Ye L., George J. M. (2003) Epitope mapping and specificity of the anti-alpha-synuclein monoclonal antibody Syn-1 in mouse brain and cultured cell lines. *Neurosci Lett* **349**, 133–135.
- Phillips R. J., Walter G. C., Wilder S. L., Baronowsky E. A., Powley T. L. (2008) Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience* **153**, 733–750.
- Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., et al. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y)* **276**, 2045–2047.
- Pouclot H., Lebouvier T., Coron E., Varannes des S. B., Rouaud T., Roy M., Neunlist M., Derkinderen P. (2012) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **45**, 305–309.
- Preterre C., Corbillé A.-G., Balloy G., Letournel F., Neunlist M., Derkinderen P. (2015) Optimizing Western Blots for the Detection of Endogenous α -Synuclein in the Enteric Nervous System. *J Parkinsons Dis* **5**, 765–772.
- Shannon K. M., Keshavarzian A., Mutlu E., Dodiya H. B., Daian D., Jaglin J. A., Kordower J. H. (2012) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* **27**, 709–715.
- Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840.
- Tyson T., Steiner J. A., Brundin P. (2015) Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J Neurochem* doi: 10.1111/jnc.13449.

- 1
2
3 Visanji N. P., Marras C., Hazrati L.-N., Liu L. W. C., Lang A. E. (2014) Alimentary, my dear
4
5 Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker.
6
7 *Mov Disord* **29**, 444–450.
8
9
10 Wang W., Perovic I., Chittuluru J., Kaganovich A., Nguyen L. T. T., Liao J., Auclair J. R., et al.
11
12 (2011) A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc. Natl. Acad.*
13
14 *Sci. U.S.A.* **108**, 17797–17802.
15
16
17 Zhang W., Wang T., Pei Z., Miller D. S., Wu X., Block M. L., Wilson B., et al. (2005)
18
19 Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease
20
21 progression in Parkinson's disease. *FASEB J* **19**, 533–542.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

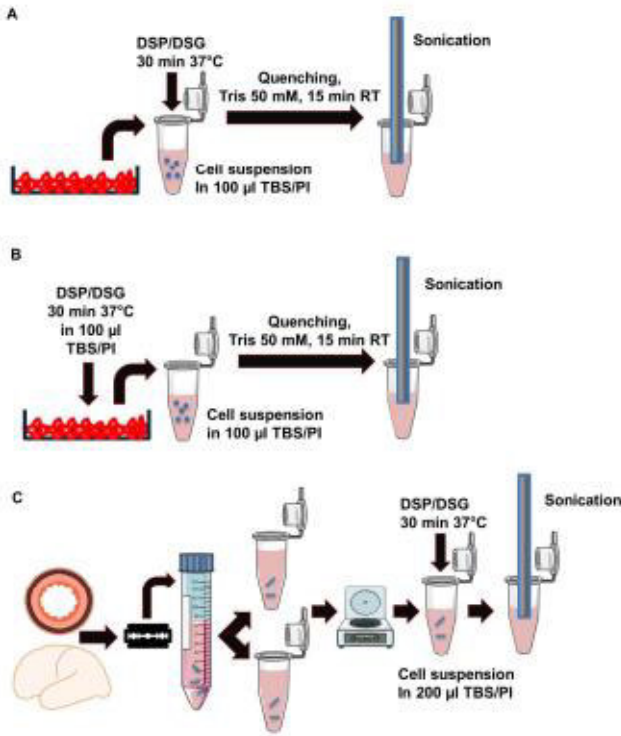


Figure 1

254x338mm (300 x 300 DPI)

Figure 2

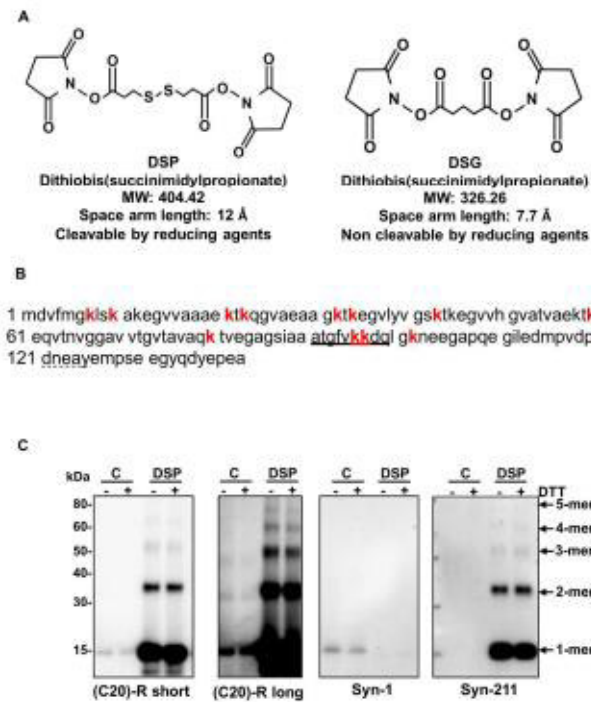


Figure 2

254x338mm (300 x 300 DPI)

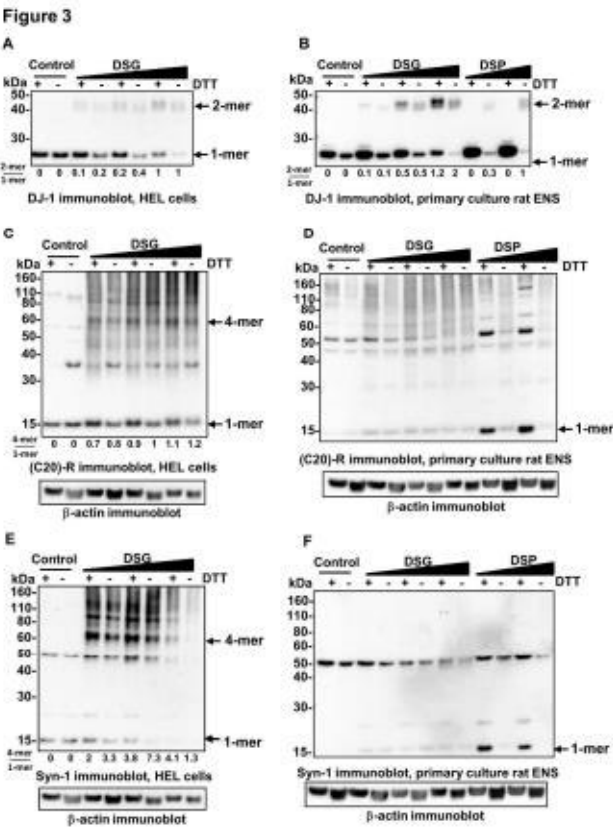


Figure 3

254x338mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

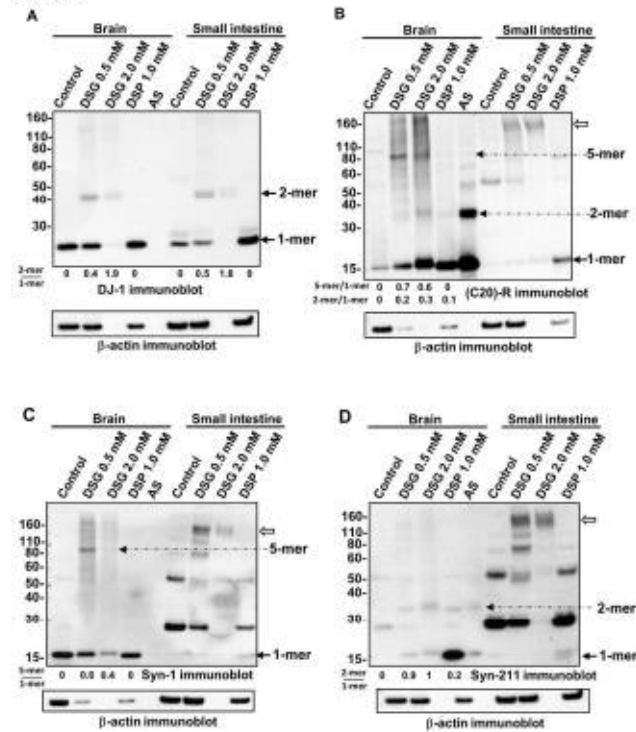
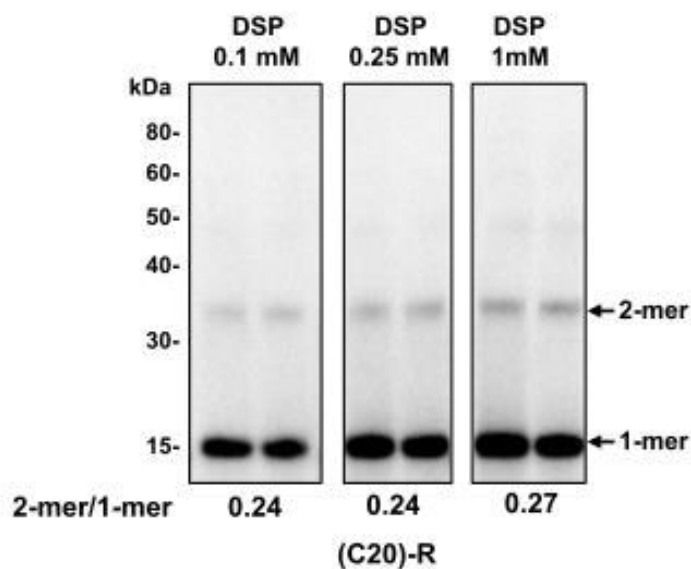


Figure 4

254x338mm (300 x 300 DPI)

Supplementary Figure 1



Legend to supplementary Figure 1 Oligomeric alpha-synuclein was treated with 0.1, 0.25 and 1 mM DSP in the presence of the reducing agent DTT and analyzed (60 ng/well) by immunoblotting with (C20)-R antibodies. The position of the monomer/multimers (1-mer/2-mer) is indicated on the right and the ratio calculated.

DISCUSSION

Alors que les premières descriptions de corps de Lewy dans le SNE des patients parkinsoniens datent de la fin des années 80 (Kupsky et al., 1987; Wakabayashi et al., 1988), l'atteinte du SNE occupe une place croissante dans le domaine de la recherche sur la MP depuis les dix dernières années, et ceci pour plusieurs raisons déjà mentionnées : (i) l'accès possible au tissu digestif du vivant du patient laisse entrevoir la possibilité de diagnostiquer la MP avec des données histologiques du vivant du patient; (ii) la présence précoce des symptômes digestifs, type constipation, laisse penser que l'atteinte pathologique entérique puisse aussi débiter précocement au niveau du SNE, voire être le site d'initiation du processus pathologique comme les suggèrent les partisans de l'hypothèse de Braak.

1 Phénotype neurochimique du SNE au cours de la MP

Bien que les symptômes gastro-intestinaux et la neuropathologie de Lewy dans le SNE soient fréquents, le lien causal entre les deux n'est pas clair et les études clinico-pathologiques détaillées sont rares. L'étude du phénotype neurochimique du SNE est un élément clé pour comprendre la physiopathologie des symptômes gastro-intestinaux. Nos résultats obtenus par analyses IHC et western blot à partir de biopsies coliques humaines n'ont pas décelé de perte neuronale significative ni de modification de la proportion des neurones dopaminergiques dans le SNE du plexus sous muqueux. Ils sont néanmoins limités par un nombre restreint de sujet. Ces données sont en accord et viennent compléter l'étude d'Annerino en 2012 qui ne retrouve pas de perte neuronale ni de modification du phénotype neurochimique dans le plexus myentérique (Annerino et al., 2012). Par contre ils s'opposent clairement à la publication de Singaram en 1995 souvent citée en tant qu'argument pour une perte massive de neurones dopaminergique dans le SNE (Singaram et al., 1995). En regardant de plus près cette étude on remarque cependant que cette équipe non plus ne mettait pas en évidence de baisse des neurones marqués par la TH. Le phénotype neuronal TH positif correspond aux neurones dopaminergiques intrinsèques ou noradrénergique extrinsèque, mais la quantification des corps cellulaires TH positifs au sein des plexus correspond à la population intrinsèque. Le comptage

des neurones par des anticorps anti-dopamine, retrouvaient une diminution, mais non significative, des neurones marqués dans les plexus myentériques ou sous muqueux coliques des patients parkinsoniens. Seule l'analyse par chromatographie liquide à haute performance révélait une chute de la concentration en dopamine, uniquement dans la muscularis externa, des parkinsoniens comparativement aux témoins. L'ensemble de ces données concordent finalement pour conclure qu'il n'y a pas de baisse neuronale dans le SNE colique dans la MP.

Par ailleurs, l'innervation colique est sous le contrôle de l'innervation extrinsèque, schématiquement excitatrice par le parasymphatique et inhibitrice par le sympathique. Ces deux systèmes sont, tout comme le SNE, siège de la pathologie de Lewy dans la MP et sont susceptibles d'être touchés. Les travaux effectués par Lebouvier notaient d'ailleurs dans le plexus sous muqueux colique que 60 % des fibres nerveuses atteintes par la STL étaient des fibres marquées par la DBH, ce qui fait suspecter une altération de l'innervation extrinsèque noradrénergique (Lebouvier et al., 2010a) tout comme d'autres travaux dans d'autres sites anatomiques (Beach et al., 2010; Gelpi et al., 2014; Orimo et al., 2007). Nos résultats sur la quantification de l'expression de la DBH dans les biopsies n'apportent pas d'arguments dans ce sens, en ce qui concernent l'innervation sympathique. L'innervation parasymphatique a été récemment explorée *in vivo* par imagerie par émissions de positons utilisant un ligand de l'acétylcholine estérase, utilisé comme marqueurs des neurones cholinergiques. Les auteurs ont mis en évidence une baisse significative de la fixation intestinale et pancréatique chez les patients parkinsoniens comparativement aux témoins, suivant le pattern de l'innervation vagale, suggérant une atteinte de l'innervation parasymphatique vagale (Gjerløff et al., 2015). Ce résultat est à confirmer mais apporte des arguments forts en faveur d'une dénervation vagale du SNE, tout à fait compatible avec la perte neuronale observée dans le noyau dorsal du nerf vague (Benarroch et al., 2006).

De plus, il est aussi possible que le ralentissement la motilité colique soit lié à un dysfonctionnement neuronal plus qu'à une perte en neurones. On peut raisonnablement penser que la présence d'une STL dans les neurones conduise à un dysfonctionnement de la neurotransmission au niveau du SNE. De façon très intéressante il existe un modèle murin de MP dans lequel la surexpression de l' α -synucléine humaine sauvage sous le promoteur Thy1

entraîne une pathologie de Lewy dans le SNE précocement, avant l'atteinte du striatum. Ces souris présentent très rapidement un ralentissement de la défécation, sans altération du phénotype neurochimique du SNE, suggérant que le dysmotilité colique est indépendante de l'atteinte morphologique du SNE (Wang et al., 2012). Elle serait secondaire là aussi soit à une dysfonction neuronale induite par la surexpression de l' α -synucléine, soit à une neurodégénérescence de l'innervation extrinsèque, non explorée sans cette étude. De plus la surexpression dans des souris de variants de l' α -synucléine humaine mutée A52T ou A30P induit là aussi une pathologie de Lewy dans le SNE associée à un dysfonctionnement colique, précoce avant l'atteinte neurologique centrale (Kuo et al., 2010). Ces deux modèles de surexpression de l' α -synucléine apportent des arguments pour une toxicité fonctionnelle directe ou indirecte de l' α synucléine pathologique sans altération neurochimique du SNE. De plus l'étude de Greene sur un autre modèle parkinsonien, l'intoxication à la roténone mettent clairement en évidence un défaut de fonction des neurones entériques inhibiteurs responsable d'une inhibition entérique sans modification là non plus du phénotype neurochimique de l'ENS (Greene et al., 2009).

Enfin, les rares données chez l'homme soulignent également le rôle des cellules interstitielles de Cajal en révélant qu'il existe, outre une perte neuronale, une baisse de ces cellules dans le colon de sujets ayant une constipation chronique idiopathique (Lyford et al., 2002; Wedel et al., 2002).

Au total, l'ensemble de ces données suggèrent que le dysfonctionnement colique observé au cours de la MP, ne soit pas lié ni à une perte neuronale ni à une modification du phénotype neurochimique dans le SNE bien que ce dernier soit le siège de la pathologie de Lewy. Les hypothèses physiopathologiques les plus probables sont l'atteinte de l'innervation extrinsèque régulant le SNE ou un dysfonctionnement neuronal sans perte neuronale, secondaire ou non à la pathologie de Lewy.

L'absence de corrélation entre la densité des corps de Lewy et la perte neuronale a été déjà soulignée à plusieurs reprises, dans la substance noire ou dans le cortex cérébral par exemple (Greffard et al., 2010; Jellinger, 2009). L' α -synucléine pathologique peut avoir de conséquences

fonctionnelles sur l'activité neuronale, par la perte de fonction de la syn physiologique au niveau présynaptique ou par un gain de fonction de l' α -synucléine pathologique (oligomérique ou fibrillaire), en influant sur la neurotransmission, le transport axonal, le fonctionnement mitochondrial entre autres (Benskey et al., 2016).

A l'heure actuelle la toxicité de l' α -synucléine entérique dans la physiopathologie des troubles gastro-intestinaux de la MP reste plausible mais doit être éclaircie. Outre son rôle pathogène dans le développement des symptômes digestifs, l' α -synucléine présente dans le tissu digestif offre un intérêt majeur en tant que possible biomarqueur histologique accessible du vivant de la MP.

2 α -synucléine entérique un biomarqueur de la MP ?

2.1 Vers une nouvelle définition de la MP

La MP est une maladie neurodégénérative dont l'origine n'est pas identifiée, vraisemblablement multifactorielle. Il existe quelques cas de MP génétiques qui constituent une minorité des cas (<10% des cas) (Lesage and Brice, 2009). Les facteurs génétiques les plus souvent rencontrés ont un phénotype clinique variable et une pénétrance incomplète soulignant le rôle des facteurs environnementaux associés. Il s'agit d'une maladie complexe et hétérogène dans ses manifestations cliniques et son évolutivité. Elle se manifeste par des symptômes variés et à des degrés différents selon les patients. Le diagnostic de certitude est neuropathologique par la constatation d'une perte neuronale de la substance noire associée à la présence d'une pathologie de Lewy. En pratique, le diagnostic est probabiliste, essentiellement clinique, et se fait par la constatation de symptômes moteurs évocateurs, ie un syndrome parkinsonien asymétrique corrigé par la L Dopa, une instabilité posturale relative, sans éléments en faveur d'un diagnostic différentiel. Pourtant la MP n'est plus considérée comme une maladie uniquement motrice, mais plutôt comme une maladie multi-système et évolutive. Elle se manifeste par un large spectre de symptômes non moteurs, dont certains peuvent apparaître très précocement, jusqu'à 20 ans avant l'apparition des symptômes moteurs pour la

constipation. La prévalence des symptômes non moteurs augmente néanmoins avec la durée d'évolution de la maladie. Cette évolution spatio-temporelle suggère que le processus pathologique débute des années avant le diagnostic et qu'il s'étend bien au-delà de la substance noire. Le challenge actuel est de comprendre où et comment se développe le processus pathologique initial et quels facteurs influent sur la progression spatiotemporelle des lésions. Parmi les hypothèses émises, la propagation caudo-rostrale à partir du SNE ou des voies olfactives jusqu'aux régions cérébrales, de proche en proche, a certains attraits. Néanmoins, le pattern de progression de Braak est débattu et ne semble pas universel. La MP regroupe vraisemblablement des entités hétérogènes. Des nombreux travaux sont en cours afin de terminer des sous types physiopathologiques de MP, en fonctions des sous types cliniques des patients (Fereshtehnejad et al., 2015; Nutt, 2016; Sauerbier et al., 2016). Ces concepts relativement récents ont conduit à revisiter le diagnostic de MP, avec l'intégration de certains symptômes non moteurs comme critères diagnostiques à part entière, dans l'objectif principal est de diagnostiquer plus tôt la maladie, en phase « prodromale » avant que les dégâts neuronaux soient trop importants (Berg et al., 2015; Postuma et al., 2015). De plus le diagnostic précoce permettrait de tester plus efficacement des traitements visant à ralentir la progression et la sévérité des lésions.

La recherche de biomarqueurs diagnostiques de la MP est au cœur de nombreux travaux. Parmi les biomarqueurs envisagés, ceux qui concernent l'atteinte digestive est intéressante pour plusieurs raisons : elle fait partie des symptômes les plus précoces dans l'évolution naturelle de la maladie, elle est très fréquemment présente chez les patients. Le SNE constitue un candidat optimal à étudier de par son homologie et son lien anatomique étroits avec le SNC. Il est très fréquemment touché par la pathologie de Lewy et il est accessible du vivant du patient sans trop de risque par une biopsie colique superficielle (Lebouvier et al., 2009, 2010b).

2.2 Apport de l'analyse IHC de l' α -synucléine dans les biopsies coliques

Les travaux réalisés au laboratoire étaient précurseurs dans ce domaine et très prometteurs puisqu'ils montraient que la détection en IHC d' α -synucléine phosphorylée dans les

biopsies coliques « whole-mount » permettaient de détecter les parkinsoniens avec une sensibilité et spécificité de 100% par rapport aux témoins. La technique est malheureusement trop contraignante pour pouvoir être déployée à grande échelle et être utilisée comme biomarqueur en pratique clinique. L'IHC sur coupes de biopsies incluses en paraffine s'adapte mieux pour cette application, mais les résultats publiés dans la littérature avec cette méthode sont divergents. Nous avons donc cruellement besoin d'études standardisées multicentriques à plus grande échelle afin de déterminer la sensibilité et la spécificité vis-à-vis de la MP de manière fiable et reproductible entre les laboratoires. Nous avons montré que les 4 méthodes IHC visant à étudier l' α -synucléine dans les biopsies coliques humaines que nous avons cherchées à évaluer étaient limitées par des problèmes de spécificité puisqu'elles mettaient en évidence un marquage chez tous les témoins. De plus le marquage de la STL observé sur des coupes quasi adjacentes était de localisation et de morphologie très variable selon les méthodes utilisées. Le problème de spécificité peut être lié à la détection de l' α -synucléine physiologiquement exprimée chez les sujets témoins, à un problème de spécificité antigénique de la méthode dans ce tissu.

Le tissu digestif exprime l' α -synucléine de façon physiologique dans les neurones (Böttner et al., 2012; Phillips et al., 2008), mais aussi, dans les cellules hématopoïétiques (Nakai et al., 2007), (Kim et al., 2004), (Li et al., 2002)), les cellules endothéliales et musculaires lisses (Tamo et al., 2002) (Askanas et al., 2000). Afin d'améliorer la spécificité de la détection de la STL dans les biopsies l'immunodétection utilisant un anticorps dirigé contre l' α -synucléine phosphorylée semble donc à privilégier. Néanmoins, Böttner retrouve que l' α -synucléine est abondamment exprimée dans le PSM et le PM du SNE et retrouve notamment un marquage P-Ser129- α -synucléine chez les témoins qui augmente avec l'âge (Böttner et al., 2012). Ces constatations peuvent être liées à la phosphorylation basale de l' α -synucléine, par analogie avec le cerveau, où 4% de l' α -synucléine est phosphorylée sur la sérine 129 (Fujiwara et al., 2002) ou à la présence de corps de Lewy incidents, qui atteint au niveau cérébral de 5 à 31% des sujets âgés en bonne santé, jusqu'à 41% des plus de 80 ans (Alafuzoff et al., 2008; Elobeid et al., 2016; Jellinger, 2004; Knopman et al., 2003; Parkkinen et al., 2003). Si l'hypothèse d'une progression caudo-rostrale est exacte la prévalence des corps de lewy au niveau du SNE serait encore plus

élevée. Pour autant il est vraisemblable que les données d'IHC souffrent de problèmes de spécificité du marquage antigénique. Nos double-marquages phospho-Ser129- α -synucléine et marquage neuronal ne détectent en effet qu'un marquage exclusivement non neuronal. Nos résultats sont concordants avec l'étude d'Aldecoa, dans lequel l'immuno-marquage obtenu par quatre anticorps différents phospho-Ser129- α -synucléine revêt des pattern d'immuno-réactivité variés, d'aspect neuronal spécifique et non spécifique (Aldecoa et al.). Il est intéressant de noter que dans le SNC les différents anticorps dirigés contre l' α synucléine phosphorylée reconnaissent les corps de Lewy avec la même propension mais sont variables dans leur capacité à révéler les neurites et terminaisons axonales (Alafuzoff et al., 2008; Beach et al., 2008b; Croisier et al., 2006). De façon très intéressante la question de la spécificité des anticorps anti phospho-Ser129- α -synucléine a été récemment remise en cause par la constatation d'une réactivité croisée importante de la majorité des anticorps dirigés contre la phospho-Ser129- α -synucléine avec les neurofilaments phosphorylés sur la serine 473 (Waxman et al., 2008). Une alternative à l'utilisation des anticorps anti P-synucléine peut alors être d'utiliser des anticorps dirigés contre des formes pathologiques de l' α synucléine, de type agrégée ou oligomérique (Vaikath et al., 2015). Nous pouvons de plus nous aider d'un double marquage neuronal ou de la morphologie et de la localisation histologique du marquage, afin de ne prendre en considération pour la STL que le marquage compatible avec un marquage neuronal. Cette dernière approche est celle que nous avons utilisée dans notre étude multicentrique sur les coupes de colon *post mortem* et qui a sans doute permis d'améliorer la spécificité de la cotation. Elle limite néanmoins l'analyse de la STL à la STL neuronale, alors que l'hypothèse d'une STL non neuronale n'est pas exclue (Ruffmann and Parkkinen, 2016).

Concernant la spécificité de la STL pour le diagnostic de la MP vis-à-vis d'autres maladies neurodégénératives, une étude de notre laboratoire a été effectuée et met en évidence une STL chez un des six patients atteints d'atrophie multisystématisée (Pouclet et al., 2012b), suggérant que le SNE soit également atteint dans d'autres synucléinopathies.

En dehors du problème de la spécificité, la question de la sensibilité de la STL entérique dans le tissu gastro-intestinal est déterminante. Nos résultats sur les biopsies coliques sont décevants car aucune des quatre méthodes n'a de sensibilité satisfaisante vis-à-vis du diagnostic

de MP. Par contre, en utilisant des coupes de colon prélevé au cours d'autopsie, plusieurs méthodes IHC permettent de détecter l' α -synucléine de façon plus sensible, jusqu'à 100 % pour une méthode (article 3). Bien que limité par le petit effectif de l'étude, on peut remarquer que la prévalence de la STL est plus élevée dans le PSM contenu dans la sous muqueuse et dans le PM. L'analyse IHC à partir de biopsie colique de routine, superficielle, est, elle, basée essentiellement sur de la muqueuse, et plus rarement de la sous muqueuse, ce qui diminue fortement la quantité de tissu neuronal potentiellement touché par la STL. Pour pallier à cette limitation, on peut envisager d'augmenter le nombre de biopsies par patient. Un seuil de 4 biopsies a été proposé par Sanchez pour détecter de façon fiable la STL dans les biopsies gastriques de patients (Sánchez-Ferro et al., 2014). On pourrait aussi augmenter l'épaisseur des coupes de 4 μ m à 150 μ m sur tissu congelé comme l'a fait l'équipe de Braak (Braak et al., 2006b). On pourrait également restreindre l'analyse des biopsies uniquement à celles contenant suffisamment de sous muqueuse. Cette surface minimale sera à déterminer lors d'étude ultérieures. L'analyse des IHC pourrait être améliorée et harmonisée en s'aidant d'une standardisation en fonction de la surface totale de la biopsie, voire des proportions des structures histologiques présentes (muqueuse, sous-muqueuse). On pourrait également envisager d'avoir recours à des biopsies plus profondes permettant d'accéder à plus de PSM et au PM, si le risque de complications de la procédure n'est pas trop important.

En conclusion, la STL entérique contenue dans les biopsies coliques en paraffine constitue un biomarqueur histologique potentiel intéressant, mais des travaux restent à faire afin d'optimiser la spécificité et la sensibilité de la méthode. La spécificité est un élément majeur à prendre en compte dans le développement d'un biomarqueur à visée diagnostique de la MP. En effet la prévalence de la maladie étant relativement faible, le risque de faux positifs est augmenté et la valeur prédictive positive est faible. La valeur prédictive positive du biomarqueur histologique pourra être améliorée en sélectionnant les patients à risque d'avoir une MP, en combinant d'autres biomarqueurs, cliniques ou paracliniques. L'analyse biochimique de l' α -synucléine pourrait aussi être utile en tant qu'analyse complémentaire.

2.3 Apport de l'analyse biochimique de l' α -synucléine dans les biopsies coliques

Alors que de nombreuses études ont porté sur la caractérisation de l' α -synucléine entérique dans le tissu gastro-intestinal par IHC, aucune étude n'a été effectuée à ce jour chez l'homme par une approche biochimique de type western blot. Cela peut s'expliquer par le fait de difficultés techniques : le taux d'expression d' α -synucléine est faible dans ces tissus, et la protéine, soluble et de petite taille, est probablement mal transférée ou mal immobilisée sur les membranes de blot. Pourtant cette technique biochimique est reconnue comme étant plus sensible que l'immunohistochimie. En s'inspirant des études de Lee et Newman (Lee and Kamitani, 2011; Newman et al., 2013), nous avons optimisé l'immuno-détection de l' α -synucléine dans le tissu intestinal en améliorant sa rétention à la membrane de western blot. Nous avons montré que la fixation des protéines à la membrane PVDF avec le paraformaldéhyde améliorait la détection de l' α -synucléine entérique physiologique et que l'amélioration était encore plus marquée lorsque les échantillons prétraités avec un agent cross-linker réductible, le DSP. Le DSP est un agent cross linker amine-amine réductible., qui peut augmenter la rétention à la membrane en augmentant l'hydrophobicité de l' α -synucléine, riche en lysine (Newman et al., 2013).

Ainsi nous avons pu comparer l'expression de l' α synucléine dans les biopsies coliques entre les témoins et les parkinsoniens. Malgré l'optimisation de la procédure, certaines biopsies n'ont pas pu être analysée car ne contenant vraisemblablement pas assez de tissu neuronal. Nos résultats préliminaires indiquent néanmoins que le taux d' α -synucléine soluble, cytosolique et /ou membranaire (dans un tampon de lyse contenant 1% de détergent NP-40) ne semble pas modifié au cours de la MP. Ces résultats sont concordants avec les études publiées sur l'expression de l' α -synucléine dans le cerveau *post mortem* de patients parkinsoniens. Ils sont à interpréter en gardant à l'esprit le différentiel de solubilisation de l' α -synucléine pathologique et agrégée. Dans le cerveau de patients atteints de Parkinson ou de DCL l' α -synucléine pathologique est concentrée dans les corps de Lewy sous forme agrégée. Elle est donc fortement augmentée dans la fraction particulaire des échantillons cérébraux après ultracentrifugation et lyse dans un tampon de lyse riche en détergent et agents dénaturants

(Sodium dodecyl sulfate(SDS), guanidine, urée). Elle est également présente mais le plus souvent non augmentée dans les fractions solubles du lysat tissulaire, que ce soit dans les fractions cytosolique ou cytoplasmique (Anderson et al., 2006; Campbell et al., 2000; Iwatsubo; Zhou et al., 2011), mais également dans les fractions membranaires, SDS solubles (Tong et al., 2010; Zhou et al., 2011). Néanmoins des formes de hauts PM ont été mises en évidence dans des fractions membranaires dans la substance noire (Tong et al., 2010) et dans des fractions solubles, pouvant correspondre à des oligomères d' α -synucléine solubles (Paleologou et al., 2009). Quelques équipes ont détecté une diminution de la quantité de la protéine dans la fraction soluble (Quinn et al., 2012) qui semble associée à une diminution du rapport de l' α -synucléine cytosolique sur membranaire (Tong et al., 2010). Nous n'avons pas observé de telle différence dans notre étude, car nous avons solubilisé les deux fractions en même temps en utilisant le détergent NP-40 et ne pouvions donc pas distinguer un changement du rapport des fractions cytosolique / membranaire.

L'utilisation du détergent NP40 confère des propriétés de solubilisation modérées, qui peuvent être suffisantes pour solubiliser l' α -synucléine sous forme phosphorylée. Des études montrent qu'elle est détectée et augmentée dans le cerveau *post mortem* de DCL par différents tampons de lyse (CHAPS, sarkosyl, NP-40)(Lue et al., 2012; Muntané et al., 2012). Elle semble augmentée précocement dans les zones cérébrales avant la formation de corps de Lewy (Klucken et al., 2006; Walker et al., 2013). Malheureusement malgré l'optimisation de la procédure d'immunodétection de l' α -synucléine, nous n'avons pas eu assez d'échantillons analysables pour quantifier de façon correcte le taux d' α -synucléine phosphorylée sur la sérine 129 dans les biopsies coliques de patients parkinsoniens.

Nous avons par contre pu évaluer les modifications post-traductionnelles de façon globale en lysant les biopsies coliques dans un tampon de lyse à fort pouvoir solubilisant contenant 7mM urée 2mM thio-urée et 4 % CHAPS, que nous avons fait migrer pour une électrophorèse bidimensionnelle. Etonnamment nous n'avons pas vu de différence de profil de migration évident entre l' α -synucléine contenue dans les biopsies coliques de témoins et de parkinsoniens. Nous n'avons pas mis en évidence de modifications post-traductionnelles de l' α -synucléine, de type de celles des formes agrégées présentes dans le cerveau de malades à corps

de Lewy (Anderson et al., 2006), alors que nous les avons retrouvées dans notre échantillon de cerveau pathologique. Ceci peut être lié au tampon de lyse inadéquat pour solubiliser l' α -synucléine agrégée dans le tissu colique ou à l'absence de modifications post-traductionnelles ou bien, plus probablement, à la trop faible quantité de la protéine contenue dans les biopsies. Il a été estimé qu'une biopsie colique de routine contenait environ 150 neurones (Lebouvier et al., 2010b), ce qui représente une très faible quantité théorique d' α -synucléine (environ 1ng si on estime que l' α -synucléine représente 1 % des protéines neuronales).

Nos résultats sont encore préliminaires et nos analyses ont été fortement limitées par la quantité d' α -synucléine contenue dans les biopsies coliques de routine. Tout comme pour l'analyse des biopsies en IHC, il faudra envisager de multiplier les biopsies analysées par patient. De plus, afin d'améliorer la sensibilité de la détection de l' α -synucléine, il faudrait coupler les analyses western blot et 2D à une étape d'enrichissement préalable des échantillons en α -synucléine, par immunoprécipitation. L'extraction différentielle permettrait aussi d'enrichir les échantillons en α -synucléine insoluble et permettrait d'évaluer les propriétés de solubilisation de l' α -synucléine entérique en conditions physiologiques et dans la MP. Je n'ai malheureusement pas pu finaliser ces deux aspects lors de mon travail de thèse. Une autre approche serait d'utiliser les propriétés d'élongation et d'amplification cyclique de l' α -synucléine (Herva et al., 2014). Enfin une autre perspective intéressante dans le contexte de développement d'un biomarqueur de la MP serait de travailler sur la détection des modifications précoces qui caractérisent l' α -synucléine pathologique : phosphorylation, troncations, ubiquitination (Schmid et al., 2013).

3 L' α -synucléine entérique a-t-elle des propriétés différentes de l' α -synucléine cérébrale ?

Comment et où s'initie le processus pathologique de la MP sont des questions essentielles dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie et dans l'optique de développer des traitements neuroprotecteurs (« *Disease-modifying therapy* »). Une hypothèse

actuelle suggère que le processus pathologique pourrait être induit par l'environnement (pesticides ou autre toxique) au contact de l'épithélium olfactif ou digestif, transmis sous forme de protéine ayant des capacités de propagation de type prion, représentée par l' α -synucléine pathologique, et propagé de proche en proche à des cellules vulnérables. La structure native de l' α -synucléine endogène est un élément du processus et a conduit à de nombreux travaux et fait encore débat (Bartels et al., 2011; Burré et al., 2013; Fauvet et al., 2012; Mor et al., 2016; Uversky, 2015). Nous avons cherché à caractériser et surtout à comparer la structure native de l' α -synucléine entérique et cérébrale en conditions physiologiques. Nous avons montré que le cross-linking de l' α -synucléine dans des cellules intactes non lysées (« *in vivo* ») ne permet pas de révéler de conformères autre que les monomères de la protéine en western blot, alors qu'il induit ou révèle la présence de dimères et pentamères dans le cerveau.

La présence de ces « oligomères » en conditions physiologiques dans le cerveau est décrite dans plusieurs publications (Bartels et al., 2011; Cole et al., 2002; Dettmer et al., 2013; Gould et al., 2014) mais est largement discutée (Araki et al., 2016). L'étude de Theillet et collaborateurs permet en effet d'appréhender la structure native de l' α synucléine dans des cellules neuronales intactes par imagerie « in cell » RMN (résonance magnétique nucléaire) couplée à l'EPR. Les auteurs ont décelé que l' α -synucléine à différentes concentrations se structurerait exclusivement en monomères solubles cytoplasmique dans des cellules (Theillet et al., 2016). Ainsi si des tétramères sont présents ils sont vraisemblablement instables et minoritaires par rapport au monomère (<20 %). De plus une limitation théorique du cross-linking chimique est que les oligomères ne soient qu'artificiellement induits par le cross-linking par le DSP. Pour autant il est intéressant de noter que d'autres protéines comme l'actine, également riche en lysine n'est pas dimérisée ou tétramérisée par le DSP alors que le dimère de DJ1 est lui révélé. De plus les expériences de Cole en 2012 montrait qu'il s'agit bien d'un cross-linking intermoléculaire d' α -synucléine, et non d'un crosslinking non spécifique avec toutes molécules riches en lysines avoisinantes, puisque le même profil d'oligomères est aussi retrouvé en présence d' α -synucléine recombinante (Cole et al., 2002).

Quoiqu'il en soit, nos résultats indiquent que l' α -synucléine native entérique semble essentiellement sous forme monomérique et a une propension différente à s'assembler que l' α -

synucléine cérébrale. L'équipe de Dettmer propose que l' α -synucléine cérébrale est en équilibre dynamique entre tétramère et monomère. Des mutations de l' α -synucléine sont associées à une diminution du rapport tétramère/monomère dans leur protocole expérimental. D'après leur résultats, l'instabilité du tétramère pourrait donc favoriser la survenue de la trans-conformation et de la forme pathologique de l' α -synucléine (Dettmer et al., 2015). Ainsi l' α -synucléine entérique, essentiellement monomérique, serait éventuellement plus sujette à devenir pathologique que l' α -synucléine cérébrale. Nos résultats ne sont que préliminaires. L'état natif de l' α -synucléine devra être exploré par d'autres approches, par électrophorèse en conditions natives non dénaturantes, ou par des techniques d'imagerie *in vivo* comme la RMN in cell ou l'utilisation de sondes de détection d'oligomères par exemple (Hernandez et al., 2013).

CONCLUSION

En conclusion ce travail de thèse a permis d'affiner la compréhension de la physiopathologie des troubles gastro-intestinaux dans la MP, et de poursuivre la caractérisation de la STL au niveau du SNE en tant que potentiel biomarqueur diagnostique en mettant en évidence des méthodes IHC performantes qui devront être testées à grande échelle afin de déterminer les valeurs diagnostiques de ce marqueur vis-à-vis de la MP dans la population générale et vis-à-vis des diagnostics différentiels, que ce soit d'autres synucléinopathies (atrophie multisystématisée) ou de tauopathies (paralysie supranucléaire progressive). Cette approche pourrait enrichir la palette des critères pré-moteurs potentiels afin de diagnostiquer précocement la MP et a l'intérêt d'être basée sur une analyse neuropathologique. D'autre part, nous avons étudié pour la première fois l'état natif de l' α -synucléine contenue dans le SNE et avons montré que la protéine est différente de celle du cerveau et semble essentiellement sous forme monomérique. Nous apportons ainsi des éléments de compréhension dans la physiopathologie de la MP. Si le SNE est le siège de l'initiation du processus pathologique de nombreux travaux restent à faire pour comprendre comment et pourquoi l' α -synucléine entérique devient pathologique. Le diagnostic précoce et la compréhension des mécanismes initiateurs de la maladie offriraient ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques dans cette maladie.

ARTICLES DE REVUE

What a gastrointestinal biopsy can tell us about Parkinson's disease?

Corbillé AG, Clairembault T, Coron E, Leclair-Visonneau L, Preterre C, Neunlist M, Derkinderen P.

Neurogastroenterol Motil. 2016 Jul;28(7):966-74. doi: 10.1111/nmo.12797. Epub 2016 Feb 23. Review.

[Is Parkinson's disease a prion disease?].

Brandel JP, Corbillé AG, Derkinderen P, Haïk S.

Rev Neurol (Paris). 2015 Dec;171(12):812-24. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.005. Epub 2015 Nov 10. Review. French.

REVIEW ARTICLE

What a gastrointestinal biopsy can tell us about Parkinson's disease?

A.-G. CORBILLÉ, *, †, ‡, §, # T. CLAIREMBAUT, *, †, # E. CORON, *, †, § L. LECLAIR-VISONNEAU, *, † C. PRETERRE, *, †
M. NEUNLIST, *, †, § & P. DERKINDEREN *, †, ‡

*Inserm, U913, Nantes, France

†Nantes University, Nantes, France

‡Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

§Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Nantes, France

Key Points

- Lewy bodies and neurites, the pathological hallmarks of Parkinson's disease are found in the enteric neurons of nearly all parkinsonian patients.
- A routine gastrointestinal biopsy contains epithelial cells, enteric glial cells, and enteric neurons.
- A substantial amount of research has been done to detect Lewy bodies and neurites in gastrointestinal biopsies in order to develop a *premortem* histopathological marker of the disease.
- Aside from neurons, the enteric glial cells and epithelial cells, which are present in a gastrointestinal biopsy, are also dysregulated in Parkinson's disease.
- A gastrointestinal biopsy could represent a unique window to assess the neuropathology in living patients with Parkinson's disease.

Abstract

Background The intraneuronal inclusions called Lewy bodies and neurites, which represent the characteristic pathological changes in Parkinson's disease, are found in the enteric neurons in the great majority of parkinsonian patients. This observation led to a substantial amount of research over the last few years in order to develop a minimally invasive diagnostic procedure in living patients based on gastrointestinal (GI) biopsies. **Purpose** In this review, we will begin by discussing the studies that

focused on the detection of Lewy bodies and neurites in GI biopsies, then broaden the discussion to the pathological changes that also occur in the enteric glial cells and intestinal epithelial cells. We conclude by proposing that a GI biopsy could represent a unique window to assess the whole pathological process of the brain in Parkinson's disease.

Keywords enteric glial cells, enteric nervous system, enteric neurons, gastrointestinal biopsy, Parkinson's disease.

Address for Correspondence

Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes 44035, France.

Tel: +33(0)240087924; fax: +33(0)240087506; e-mails:

derkinderenp@yahoo.fr and pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

#Equal contributors.

Received: 13 September 2015

Accepted for publication: 18 January 2016

The first descriptions of Lewy bodies and neurites in the enteric nervous system (ENS) in Parkinson's disease (PD) reported in the 1980s found relatively little resonance in comparison to the amount of literature devoted to the lesions in the central nervous system.^{1–3} Nevertheless, it became obvious over the last 15 years that PD is a gut disorder. Symptoms such

as dysphagia, nausea, and distension as a result of impaired gastric emptying, and bowel dysfunction, including both reduced bowel movement frequency and difficulty defecating, are among the most common non-motor symptoms of PD.^{4,5} Pathologically, Lewy bodies and neurites have been found in the ENS in nearly every case examined.⁶ These autopsy findings prompted a substantial amount of research on the detection of PD pathology using gastrointestinal (GI) biopsies in order to achieve *in vivo* pathological diagnosis of the disease (reviewed in Ref. 7). Most studies to date have therefore focused on the optimization of immunodetection of α -synuclein, the main component of Lewy bodies and neurites, in the enteric neurons.^{8–13} In this review, we will discuss recent evidence indicating that pathological changes in the gut in PD are not limited to enteric neurons but also involve the enteric glial cells (EGCs) and the intestinal epithelial cells and put into perspective the use of routine GI biopsy as a window on brain neurodegeneration in PD.

GI BIOPSY GIVES ACCESS TO THE DIGESTIVE NEURONAL–GLIAL–EPITHELIAL UNIT

On a routine basis, GI biopsies are primarily intended for analyzing the intestinal epithelial cells for the detection of digestive disorders such as colorectal cancer, inflammatory bowel disease, and peptic ulcer. Nevertheless, there is also mounting evidence to suggest that a routine GI biopsy enables easy access to the two neuronal populations of the gut, namely the EGCs and the enteric neurons. The EGCs that are lying just below the epithelial cells lining, called the mucosal EGCs, are in close proximity (in the range of 1 μ m) to the intestinal epithelial cells and are therefore easily captured by the biopsy-forceps (Fig. 1).^{14,15} The same is true for the neuronal processes sent out by neurons of both the submucosal and myenteric plexus, which terminate in direct proximity with the intestinal crypts (Fig. 1).¹⁶ We have recently proposed to name the anatomical unit between these 3 cell types the 'digestive neuronal–glial–epithelial unit' (NGEU), which might be considered as the digestive counterpart of the neuronal–glial–endothelial unit of the blood–brain barrier.¹⁷ In addition, routine biopsies can also give access to the EGCs and the neuronal cell bodies and processes of the submucosal plexus (Fig. 1). It should be, however, noted that the submucosal neurons and EGCs might be missed by the forceps because of the fishnet-like architecture of the plexus and/or because of the biopsy being too superficial (Lebouvier, Pouclet, Clairembault, and Derkinderen, unpublished).

Once the biopsy has been performed, the NGEU can be analyzed both morphologically and functionally. In order to prevent RNA and protein degradation and dephosphorylation, the biopsy may be immediately quick-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further analysis by Western Blot or PCR.^{18,19} Such an approach has proven to be useful for studying the expression levels of major proteins of the intercellular contacts between epithelial cells, such as ZO-1 and occludins,²⁰ of enteric glial markers such as S100- β and glial fibrillary acidic protein (GFAP)^{19,21} and neuronal markers such as PGP9.5 (Fig. 1).^{18,22} The biopsy can be also microdissected for a separate immunohistochemical analysis of the submucosa and the mucosa.^{9,18,23} Submucosal enteric neurons can be visualized and counted by immunohistochemistry using general neuronal markers such as Hu, PGP9.5 and high-molecular weight neurofilament.^{9,18} A whole-mount preparation of submucosa obtained from one single biopsy contains an average of 35 ganglia with three to five neurons per ganglion, thus allowing the evaluation of approximately 150 neurons.¹⁸ In parallel, the distribution of tight junctions proteins and pericryptal neuronal processes can be readily analyzed on whole-mount preparation of submucosa (Fig. 1).^{20,23} From a functional point of view, the intestinal epithelial barrier may be evaluated *ex vivo* by measuring the diffusion of fluorescent probes through biopsy samples in Ussing chambers.²⁴

MODEST NEURONAL LOSS AND LEWY PATHOLOGY IN GI BIOPSIES IN PD

PD is pathologically characterized by a loss of dopamine-containing neurons in the substantia nigra pars compacta along with the presence of intracytoplasmic inclusions, termed Lewy bodies and neurites, in the remaining surviving neurons.²⁵ Since the discovery in the late 1990s that Lewy bodies and neurites had a strong α -synuclein immunoreactivity, α -synuclein immunostaining has become the method of choice for the detection of PD pathology.^{26,27} Several autopsy studies, including one recent survey in which α -synuclein immunohistochemistry was optimized, showed that the distribution of Lewy pathology is much greater than formerly appreciated, extending to peripheral autonomic neuronal networks and especially to the ENS.^{6,28,29} This logically led several groups to develop specific methods for the detection of Lewy pathology in routine GI biopsies for the development of biomarkers that will directly assess the pathological process in living patients (see

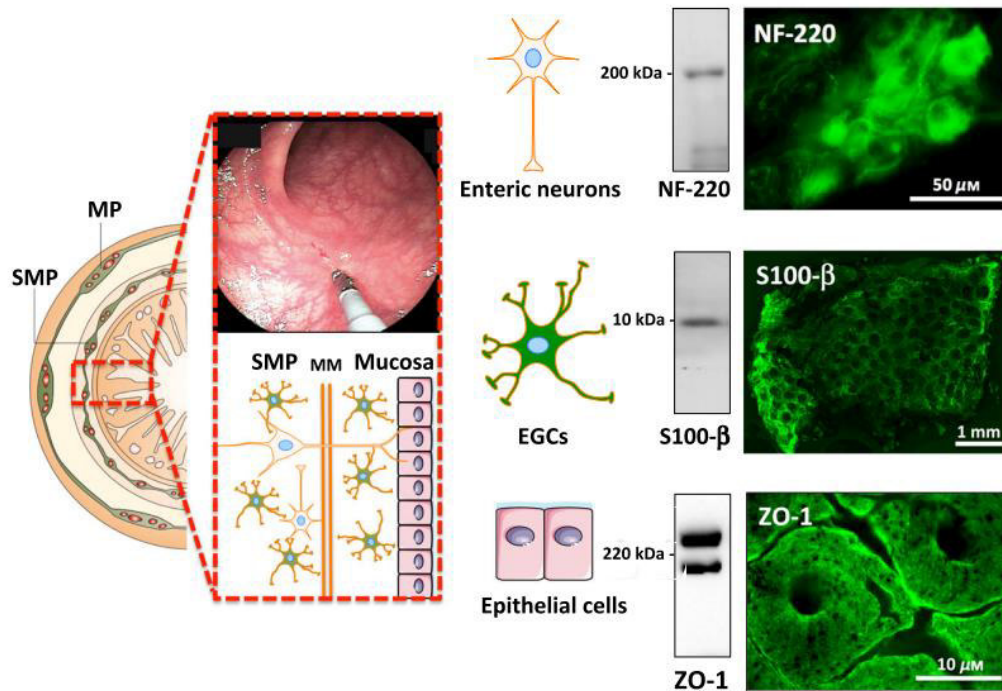


Figure 1 Cell types that can be analyzed using a routine GI biopsy. The biopsy forceps used for routine GI biopsies are capable of capturing the intestinal epithelial cells as well the enteric glial cells (EGCs) and the neuronal processes that are present in the mucosa. In addition, biopsies can also give access to the EGCs and the neuronal cell bodies and processes from the submucosal plexus (SMP). The expression levels and distribution of neuronal markers such as high-molecular weight neurofilament protein of 220 kDa (NF-220), enteric glial markers such as S100- β and tight junction proteins such as ZO-1 can be analyzed by Western blot and immunohistochemistry. MM, muscularis mucosae; MP, myenteric plexus.

Ref. 7 for a recent review). In our seminal survey on GI biopsies in PD, we have used the above-mentioned whole-mount preparation of submucosa for the detection of Lewy pathology. Twenty-nine PD patients with disease duration ranging from one to 24 years were enrolled together with 10 control subjects who had undergone colonoscopy for colorectal cancer screening.⁹ Biopsies from 21 out of the 29 PD patients showed Lewy neurites in their submucosal plexus, whereas no Lewy pathology was observed in any of the controls (Fig. 2).⁹ The clinical relevance of these findings was supported by a correlation between pathological burden and the amount of axial and dopa-unresponsive symptoms, which reflect disease progression.⁹ We further showed that the presence of α -synuclein deposits within enteric neurons is specific to PD as it was not observed in patients with atypical parkinsonism such as multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy.³⁰

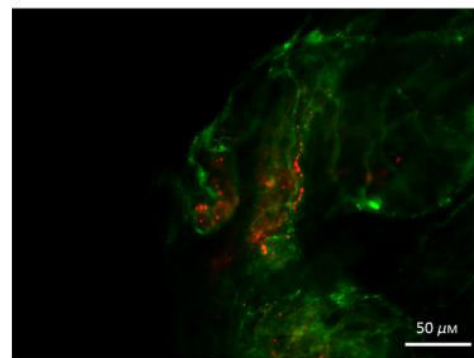


Figure 2 Analysis of the submucosal plexus by immunohistochemistry in PD. Submucosa whole mount obtained from a colonic biopsy of PD patient was stained with antibodies against PGP9.5 (green) and phosphorylated α -synuclein (red). The photomicrograph shows some co-localization of these proteins in neuritic structures reminiscent of Lewy neurites; scale bar: 50 μ m.

Although the microdissection technique we have developed provides outstanding information on the morphology of enteric neurons, it nonetheless has several limitations as it needs to be performed immediately after the endoscopic procedure and requires a skilled technician.^{9,18} Several subsequent studies have used GI biopsies that were formalin-fixed and paraffin-embedded in order to overcome the limitations of the whole mount dissection procedure. Despite the lower prevalence of Lewy pathology in the lower compared to the upper gut,^{3,6,31} the sigmoid colon and rectum have been by far the most commonly studied sites. This is likely explained because these portions of the GI tract are easily accessible via a flexible sigmoidoscope, a safe procedure that can be performed in 5–10 min without the need for sedation and colon cleansing.³² Regarding the lower GI tract, a first study demonstrated the presence of α -synuclein aggregates in the sigmoid colon of PD patients with a high sensitivity and specificity,¹⁰ but other groups did not confirm these results.^{12,13} Recently, a Spanish group performed two upper GI tract biopsies in 28 PD patients during device implantation for continuous levodopa (Duodopa).¹¹ They observed α -synuclein deposits in 17 of 28 PD patients and in only 1/23 control subjects, but another study found a lower sensitivity.¹² Although encouraging, these different studies that used paraffin-embedded samples have produced discrepancies regarding the prevalence and abundance of Lewy pathology per biopsy, either in the upper or lower GI tract. This might be partly explained by the diversity of methodology as some laboratories used total α -synuclein antibody¹⁰ while others used either phosphorylated or total α -synuclein antibodies.^{11,12} Moreover, all of these studies suffered from several limitations including the absence of replication by independent laboratories and the lack of double staining to confirm the neuronal nature of the α -synuclein immunoreactive structures.

Experience from the central nervous system strongly suggests that the motor symptoms in PD are driven primarily by neuronal loss rather than Lewy pathology.³³ As such, an evaluation of the density of enteric neurons that control GI motility and secretion is a critical step toward understanding the pathophysiology of GI symptoms in PD. Using cross sections from GI tract autopsy samples, a recent study has convincingly demonstrated that there was no neuronal loss in the myenteric plexus in PD, either in the lower or upper gut.³⁴ Concerning the submucosal plexus, immunohistochemical analysis of whole mount-preparations of endoscopically obtained biopsies revealed that there is a modest but significant 15% decrease in the submucosal neuronal density in PD patients.⁹ This moderate decrease in total neuronal

density was not associated with differences in the relative proportions of individual submucosal neuron phenotype and especially of dopaminergic neurons.²² Altogether, the results obtained with autopsy samples and biopsies show the absence of overt neuronal loss and changes in neurochemical phenotype in both the myenteric and the submucosal plexus. This suggests that the loss of intrinsic innervation of the gut is unlikely to be solely responsible for the GI manifestations so frequently encountered by PD patients and that extrinsic inputs and especially the dorsal motor nucleus of the vagus are critically involved.^{35,36}

GFAP IS OVEREXPRESSED IN GI BIOPSIES IN PD

Enteric glial cells are now regarded as the digestive counterpart of the central nervous system astrocytes (see Ref. 37 for a recent review). Indeed, both cell types are not only morphologically similar but they also share electrophysiological properties^{38,39} and express common key markers, including S100- β and the intermediate filament GFAP.^{40,41} Astrocytes respond to all forms of central nervous system insults, including neurodegeneration, through a process referred to as reactive astrogliosis.⁴² Although the denomination reactive astrogliosis encompasses a large spectrum of molecular, cellular, and functional changes, one of its key features is an increase in GFAP expression.⁴³ Whether changes in GFAP expression occurs in PD brain is still a matter of debate as existing reports are conflicting (see the discussion in Ref. 44). This might be explained by certain difficulties inherent with using *postmortem* brain tissue, such as difficulty in obtaining brain samples and the delay between death and tissue processing, which is known for inducing GFAP proteolysis.⁴⁵ These two limitations can be overcome when using GI biopsies, which, as stated above, can be easily performed and immediately frozen during the endoscopic procedure.¹⁸ By analyzing the colonic biopsies of 43 patients with an established diagnosis of PD (mean disease duration 9.8 years) and 25 age-matched healthy participants, we showed that the expression levels of GFAP was increased in the GI tract of PD patients both at the transcripts and protein levels.^{19,21} The upregulation of GFAP was accompanied by an increase in the expression of the main pro-inflammatory cytokines, including interleukin-6 which is secreted by reactive enteric glia.⁴⁶ Levels of glial markers and interleukin-6 mRNA were variable between patients and were negatively correlated with disease duration¹⁹ suggesting that GI inflammation may be higher in the early stages of the disease as

reported in the brain.⁴⁷ Interestingly, no changes in GFAP expression were observed in colonic samples from progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy patients, two neurodegenerative parkinsonian syndrome in which the ENS is pathologically spared.^{30,48} Taken together, these biochemical changes suggest that the changes observed in the gut in PD, contrasting with other parkinsonian syndromes, are not limited to Lewy pathology but also involve the EGCs. It still remains to be determined how the EGCs become activated in PD. One obvious candidate is α -synuclein, which is secreted by enteric neurons⁴⁹ and known for inducing astrocyte reaction in the central nervous system.⁵⁰

TIGHT JUNCTIONS STRUCTURE IS ALTERED IN GI BIOPSIES IN PD

Both neurons and EGCs have been increasingly recognized as major regulators of the intestinal epithelial barrier. Overall, activation of enteric neurons has been shown to result in the reinforcement of intestinal epithelial barrier functions⁵¹ while EGCs are critical for the maintenance of its integrity.^{52,53} These observations along with Braak's hypothesis proposing that PD pathology may originate in the gut⁵⁴ prompted several groups to study intestinal epithelial barrier permeability in parkinsonian patients. Three studies, which have all used absorption of sugar probes to investigate the paracellular permeability in PD subjects led to inconclusive and conflicting results.^{55–57} We, therefore, used another approach to evaluate the intestinal epithelial barrier. Colonic biopsies from PD patients were analyzed functionally using Ussing chambers and morphologically for the expression and localization of tight junction proteins.²⁰ Although the paracellular permeability in PD was not different from controls, we observed that occludin, one of the main tight junction protein, was down-regulated and redistributed from the membrane to the cytosol in biopsies

from PD subjects.²⁰ Remarkably, these changes in occludin expression and distribution were also noted in a subset of 5 patients who had never received levodopa, suggesting that they were not caused by chronic PD treatment. Although the clinical consequences of these morphological changes are still to be clarified, they support the assumption that a more permeable gut may be a starting point for neurodegeneration in PD.⁵⁴

GI BIOPSY AS A SOURCE OF BIOMARKERS IN PD

Parkinson's disease follows a slowly chronic progressive course and the motor cardinal symptoms of the disease appear only when the degenerative process has progressed for a long time, in most cases probably for more than 10–15 years.⁵⁸ The diagnosis of PD and the follow-up of disease progression are mainly based on clinical criteria and there is therefore a critical need for the development of biomarkers that will help to better diagnose the condition, define the subtypes of disease, and follow its course independently of any symptomatic drug effects.⁵⁹ In recent years, new initiatives have been undertaken to accelerate the search for new biomarkers in PD with the hope and expectation that they will be able to help diagnose PD, track its clinical course, and predict disease complications. For instance, both the National Institute of Health and the Michael J Fox Foundation for Parkinson's research have launched collaborative projects to identify new biomarkers.⁶⁰ These projects are mainly based on advanced brain-imaging techniques and analysis of body fluids. It is unlikely that one single biomarker will be capable of providing information on early diagnosis, differential diagnosis, and monitoring disease progression.^{61,62} In this context, the demonstration that the peripheral autonomic neuronal circuits are affected by the pathology, early, and specifically in a large proportion of patients has opened new insights into the development of novel and original biomarkers

Table 1 Advantages and limitations of GI biopsies for the diagnosis of PD

Pros	Cons
Sigmoid colon is easily accessible through rectosigmoidoscopy, a safe procedure that can be performed in few minutes without sedation and preparation ⁷⁴	Because of the rostro-caudal distribution of Lewy pathology in the GI tract ⁶ , use of upper digestive tract biopsies might be preferable.
Lewy pathology can be detected in GI biopsies using whole mount preparations with a good specificity and sensitivity ^{9,30}	This is limited by the potential risk of inhalation during the procedure ⁷⁵
The SMP contains neurons and glial cells that are readily accessible to routine GI biopsies ^{18,30}	Whole-mount dissections need to be performed immediately after the endoscopic procedure. ¹⁸ This is a limitation to multicenter and/or retrospective studies
	The MP, which is also a target of the disease, is not accessible to routine GI biopsies. It would be of critical interest to determine whether this plexus shows comparable abnormalities to those reported in the SMP

MP, myenteric plexus; SMP, submucosal plexus.

Table 2 Similarities between brain and gut in PD

	Brain	Gut
Lewy pathology	In all subjects except in some Parkin-associated familial PD ²³	In nearly every case examined pathologically (85–100%) ^{6,28}
Reactive glia	Changes in GFAP expression consistently reported in the SN (see ⁴⁴)	Changes in GFAP expression and phosphorylation in the colon ²¹
Inflammation	IL-6, IL-1 β and TNF- α are elevated in the striatum ^{71,72}	IL-6, IL-1 β , IFN- γ and TNF- α are elevated in the colon ¹⁹
Barrier	Functional changes of the BBB in the striatum ⁷³	Morphological and functional changes of the IEB in the colon ^{21,57}

BBB, blood brain barrier; IEB, intestinal epithelial barrier; SN, substantia nigra.

for PD that could directly evaluate the pathological process in living patients.^{6,63–65}

The ENS is not the only peripheral neuronal network affected by Lewy pathology that is accessible to biopsies. Because α -synuclein is also deposited in the autonomic circuits that innervate the skin and the submandibular glands, there has been an increasing interest in biopsying one of these sites for *in vivo* diagnosis of PD (reviewed in Ref. 7). Recent studies have indeed confirmed that skin and submandibular gland biopsies enable the detection of α -synuclein deposits in PD with a good sensitivity and specificity.^{66,67} Nevertheless, despite the potential interest of these two sites, we believe that the specific organization of the ENS makes it the best candidate tissue for developing biopsy-derived markers of PD (advantages and limitations of GI biopsies are discussed in Table 1). In contrast to skin and salivary glands, the ENS does not only contain postganglionic neuronal processes but is an integrated neuronal network that contains neuronal cell bodies and glial cells.⁶⁸ The data we have acquired so far using colonic biopsies in patients with PD enabled us to demonstrate that this whole neuronal network along with its microenvironment are dysregulated in PD.^{20,21} These observations support the hypothesis that the NGEU, by mirroring brain pathol-

ogy, might constitute an unparalleled source of biomarkers in PD (Table 2). Further work is needed to identify new digestive PD biomarkers that will demonstrate a superior sensitivity to the ones that have been proposed so far. Possible strategies might include a joint transcriptomic and proteomic analysis of the biopsies along with the analysis of biopsy supernatant, an approach that has already proven to be useful in irritable bowel syndrome.^{69,70}

ACKNOWLEDGMENTS

Work in our lab is supported by the *centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens* (CECAP), PSP France, France Parkinson and the Michael J Fox Foundation for Parkinson's research. AGC is a recipient of a *poste d'accueil Inserm*. The authors declare no actual or potential conflict of interest. All authors initially discussed the presented concepts. AGC, TC, and PD wrote the first draft. All authors edited the manuscript.

FUNDING

No funding declared.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no competing interests.

REFERENCES

- Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1984; **87**: 848–56.
- Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, Cote LJ. Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 1987; **37**: 1253–5.
- Wakahashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988; **76**: 217–21.
- Edwards LL, Pfeiffer RF, Quigley EM, Hofman R, Balluff M. Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1991; **6**: 151–6.
- Edwards L, Quigley EM, Hofman R, Pfeiffer RF. Gastrointestinal symptoms in Parkinson disease: 18-month follow-up study. *Mov Disord* 1993; **8**: 83–6.
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White III CL, Akiyama H, Caviness JN *et al*. Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2009; **119**: 689–702.
- Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A, Zorenkov D, Deuschl G, Wedel T. Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol* 2016; **23**: 247–61.
- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, Vignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP *et al*. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 2008; **57**: 1741–3.
- Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M *et al*. Colonic biopsies to assess the

- neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE* 2010; **5**: e12728.
- 10 Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, Kordower JH. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; **27**: 709–15.
 - 11 Sánchez-Ferro Á, Rábano A, Catalán MJ, Rodríguez-Valcárcel FC, Fernández Díez S, Herreros-Rodríguez J, García-Cobos E, Álvarez-Santullano MM et al. In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015; **30**: 517–24.
 - 12 Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, Broughton E, Hagan H et al. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2014; **127**: 235–41.
 - 13 Visanji NP, Marras C, Kern DS, Al Dakheel A, Gao A, Liu LW, Lang AE, Hazrati LN. Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology* 2015; **84**: 609–16.
 - 14 Hanani M, Reichenbach A. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 1994; **278**: 153–60.
 - 15 Boesmans W, Lasrado R, Vanden Berghe P, Pachnis V. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* 2015; **63**: 229–41.
 - 16 Messenger JP, Furness JB. Projections of chemically-specified neurons in the guinea-pig colon. *Arch Histol Cytol* 1990; **53**: 467–95.
 - 17 Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; **10**: 90–100.
 - 18 Leboviev T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 2010; **22**: e11–4.
 - 19 Devos D, Leboviev T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Coron E, Bruley des Varannes S et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2013; **50**: 42–8.
 - 20 Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, Bourreille A, Le Dily S, Vavasseur F, Heymann MF, Neunlist M et al. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2015; **3**: 12.
 - 21 Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM, Derkinderen P. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014; **130**: 805–15.
 - 22 Corbillé A-G, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P, Leboviev T. Appraisal of the dopaminergic and noradrenergic innervation of the submucosal plexus in PD. *J Parkinsons Dis* 2014; **4**: 571–6.
 - 23 Pouclet H, Leboviev T, Coron E, des Varannes SB, Neunlist M, Derkinderen P. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012; **24**: e202–5.
 - 24 Wallon C, Braaf Y, Wolving M, Olaison G, Söderholm JD. Endoscopic biopsies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon. *Scand J Gastroenterol* 2005; **40**: 586–95.
 - 25 Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 2009; **8**: 1150–7.
 - 26 Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; **388**: 839–40.
 - 27 Beach TG, White CL, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, Leverenz JB, Roncaroli F et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol* 2008; **116**: 277–88.
 - 28 Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Martí MJ, Hernández I et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 2014; **29**: 1010–8.
 - 29 Ito S, Takao M, Hatsuta H, Kanemaru K, Arai T, Saito Y, Fukayama M, Murayama S. Alpha-synuclein immunohistochemistry of gastrointestinal and biliary surgical specimens for diagnosis of Lewy body disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7**: 1714–23.
 - 30 Pouclet H, Leboviev T, Coron E, Rouaud T, Flamant M, Toulgoat F, Roy M, Vavasseur F et al. Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; **18**: 893–5.
 - 31 Pouclet H, Leboviev T, Coron E, des Varannes SB, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, Derkinderen P. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2012; **45**: 305–9.
 - 32 Levin TR, Conell C, Shapiro JA, Chazan SG, Nadel MR, Selby JV. Complications of screening flexible sigmoidoscopy. *Gastroenterology* 2002; **123**: 1786–92.
 - 33 Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Beinis JY, Gallinari C, Meaume S, Piette F, Hauw JJ et al. Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch Neurol* 2006; **63**: 584–8.
 - 34 Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, Greene JG. Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol* 2012; **124**: 665–80.
 - 35 Greene JG. Causes and consequences of degeneration of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2014; **21**: 649–67.
 - 36 Cersosimo MG, Benarroch EE. Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov Disord* 2008; **23**: 1065–75.
 - 37 Sharkey KA. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest* 2015; **125**: 918–25.
 - 38 Hanani M. Neurons and glial cells of the enteric nervous system: studies in tissue culture. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993; **4**: 157–79.
 - 39 Hanani M, Francke M, Härtig W, Grosche J, Reichenbach A, Pannicke T. Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **278**: G644–51.
 - 40 Jessen KR, Mistry R. Glial cells in the enteric nervous system contain

- glial fibrillary acidic protein. *Nature* 1980; **286**: 736–7.
- 41 Jessen KR, Mirsky R. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci* 1983; **3**: 2206–18.
 - 42 Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014; **81**: 229–48.
 - 43 Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 2011; **93**: 421–43.
 - 44 Tong J, Ang L-C, Williams B, Furukawa Y, Fitzmaurice P, Guttman M, Boileau I, Hornykiewicz O *et al.* Low levels of astroglial markers in Parkinson's disease: relationship to α -synuclein accumulation. *Neurobiol Dis* 2015; **82**: 243–53.
 - 45 Newcombe J, Woodroffe MN, Cuzner ML. Distribution of glial fibrillary acidic protein in gliosed human white matter. *J Neurochem* 1986; **47**: 1713–9.
 - 46 Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **280**: G1163–71.
 - 47 Gerhard A, Pavese N, Hottot G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W *et al.* In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C]R-11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006; **21**: 404–12.
 - 48 Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol* 2010; **120**: 1–12.
 - 49 Paillusson S, Clairembault T, Biraud M, Neunlist M, Derkinderen P. Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J Neurochem* 2012; **125**: 512–7.
 - 50 Lee H-J, Suk J-E, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, Hwang D, Masliah E *et al.* Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem* 2010; **285**: 9262–72.
 - 51 Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisie CL, Galmiche JP, Jarry A. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; **285**: G1028–36.
 - 52 Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998; **93**: 189–201.
 - 53 Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP *et al.* Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 2006; **55**: 630–7.
 - 54 Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; **396**: 67–72.
 - 55 Davies KN, King D, Billington D, Barrett JA. Intestinal permeability and orocaecal transit time in elderly patients with Parkinson's disease. *Postgrad Med J* 1996; **72**: 164–7.
 - 56 Salat-Foix D, Tran K, Ranawaya R, Meddings J, Suchowersky O. Increased intestinal permeability and Parkinson disease patients: chicken or egg? *Can J Neurol Sci* 2012; **39**: 185–8.
 - 57 Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, Estes JD, Dodiya HB *et al.* Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS ONE* 2011; **6**: e28032.
 - 58 Savica R, Rocca WA, Ahlskog JE. When does Parkinson disease start? *Arch Neurol* 2010; **67**: 798–801.
 - 59 Marek K, Jennings D, Tamagnan G, Scibyl J. Biomarkers for Parkinson's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Ann Neurol* 2008; **64** (Suppl. 2): S111–21.
 - 60 Parkinson Progression Marker Initiative. The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI). *Prog Neurobiol* 2011; **95**: 629–35.
 - 61 Eberling JL, Dave KD, Frasier MA. α -synuclein imaging: a critical need for Parkinson's disease research. *J Parkinsons Dis* 2013; **3**: 565–7.
 - 62 Kang J-H, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Siderowf A, Caspell C, Coffey CS, Waligorska T, Taylor P *et al.* Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naïve patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol* 2013; **70**: 1277–87.
 - 63 Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; **32**: 284–95.
 - 64 Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2009; **119**: 703–13.
 - 65 Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, Shill HA, Sue LI *et al.* Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; **72**: 130–6.
 - 66 Adler CH, Dugger BN, Hinni ML, Lott DG, Driver-Dunckley E, Hidalgo J, Henry-Watson J, Serrano G *et al.* Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology* 2014; **82**: 858–64.
 - 67 Zange L, Noack C, Hahn K, Stenzel W, Lipp A. Phosphorylated α -synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy. *Brain* 2015; **138** (Pt 8): 2310–21.
 - 68 Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007; **69**: 1953–7.
 - 69 Buhner S, Li Q, Vignali S, Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Zeller F *et al.* Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; **137**: 1425–34.
 - 70 Camilleri M, Carlson P, Acosta A, Busciglio I, Nair AA, Gibbons SJ, Farrugia G, Klee EW. RNA sequencing shows transcriptomic changes in rectosigmoid mucosa in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: a pilot case-control study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; **306**: G1089–98.
 - 71 Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha

- are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994; **180**: 147–50.
- 72 Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994; **165**: 208–10.
- 73 Gray MT, Woulfe JM. Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; **35**: 747–50.
- 74 Gatto NM, Frucht H, Sundararajan V, Jacobson JS, Grann VR, Neugut AL. Risk of perforation after colonoscopy and sigmoidoscopy: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**: 230–6.
- 75 Friedrich K, Scholl SG, Beck S, Gotthardt D, Stremmel W, Rex DK, bng-Study-Group, Sieg A. Respiratory complications in outpatient endoscopy with endoscopist-directed sedation. *J Gastrointest Liver Dis* 2014; **23**: 255–9.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, R.D., Petrovitch, H., White, L.R., Masaki, K.H., Tanner, C.M., Curb, J.D., Grandinetti, A., Blanchette, P.L., Popper, J.S., and Ross, G.W. (2001). Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 57, 456–462.
- Abbott, R.D., Ross, G.W., Petrovitch, H., Tanner, C.M., Davis, D.G., Masaki, K.H., Launer, L.J., Curb, J.D., and White, L.R. (2007). Bowel movement frequency in late-life and incidental Lewy bodies. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 22, 1581–1586.
- Adler, C.H., Dugger, B.N., Hinni, M.L., Lott, D.G., Driver-Dunckley, E., Hidalgo, J., Henry-Watson, J., Serrano, G., Sue, L.I., Nagel, T., et al. (2014a). Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology* 82, 858–864.
- Adler, C.H., Beach, T.G., Hentz, J.G., Shill, H.A., Caviness, J.N., Driver-Dunckley, E., Sabbagh, M.N., Sue, L.I., Jacobson, S.A., Belden, C.M., et al. (2014b). Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. *Neurology* 83, 406–412.
- Adler, C.H., Dugger, B.N., Hentz, J.G., Hinni, M.L., Lott, D.G., Driver-Dunckley, E., Mehta, S., Serrano, G., Sue, L.I., Duffy, A., et al. (2016). Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings. *Mov. Disord.* 31, 250–256.
- Alafuzoff, I., Parkkinen, L., Al-Sarraj, S., Arzberger, T., Bell, J., Bodi, I., Bogdanovic, N., Budka, H., Ferrer, I., Gelpi, E., et al. (2008). Assessment of alpha-synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 125–143.
- Aldecoa, I., Navarro-Otano, J., Stefanova, N., Sprenger, F., Seppi, K., Poewe, W., Cuatrecasas, M., Valdeoriola, F., Gelpi, E., and Tolosa, E. Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system. *Neurosci. Lett.*
- Alderson, T.R., and Bax, A. (2016). Parkinson's disease: Disorder in the court. *Nature* 530, 38–39.
- Anderson, G., Noorian, A.R., Taylor, G., Anitha, M., Bernhard, D., Srinivasan, S., and Greene, J.G. (2007). Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 207, 4–12.
- Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., Laat, R. de, Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., et al. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J. Biol. Chem.* 281, 29739–29752.
- Angot, E., Steiner, J.A., Lema Tomé, C.M., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., and Brundin, P. (2012). Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PLoS One* 7, e39465.

- Anlauf, M., Schäfer, M.K.-H., Eiden, L., and Weihe, E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: Cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol.* 459, 90–111.
- Annerino, D.M., Arshad, S., Taylor, G.M., Adler, C.H., Beach, T.G., and Greene, J.G. (2012). Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 665–680.
- Anwar, S., Peters, O., Millership, S., Ninkina, N., Doig, N., Connor-Robson, N., Threlfell, S., Kooner, G., Deacon, R.M., Bannerman, D.M., et al. (2011). Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 7264–7274.
- Araki, K., Yagi, N., Nakatani, R., Sekiguchi, H., So, M., Yagi, H., Ohta, N., Nagai, Y., Goto, Y., and Mochizuki, H. (2016). A small-angle X-ray scattering study of alpha-synuclein from human red blood cells. *Sci. Rep.* 6, 30473.
- Arawaka, S., Saito, Y., Murayama, S., and Mori, H. (1998). Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for alpha-synuclein. *Neurology* 51, 887–889.
- Askanas, V., Engel, W.K., Alvarez, R.B., McFerrin, J., and Broccolini, A. (2000). Novel Immunolocalization of α -Synuclein in Human Muscle of Inclusion-Body Myositis, Regenerating and Necrotic Muscle Fibers, and at Neuromuscular Junctions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 592–598.
- Barone, P., Antonini, A., Colosimo, C., Marconi, R., Morgante, L., Avarello, T.P., Bottacchi, E., Cannas, A., Ceravolo, G., Ceravolo, R., et al. (2009). The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 24, 1641–1649.
- Bartels, T., Choi, J.G., and Selkoe, D.J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110.
- Bassotti, G., Maggio, D., Battaglia, E., Giulietti, O., Spinozzi, F., Reboldi, G., Serra, A.M., Emanuelli, G., and Chiarioni, G. (2000). Manometric investigation of anorectal function in early and late stage Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 768–770.
- Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Peirce, J.B., Bachalakuri, J., Dalsing-Hernandez, J.E., Lue, L.F., Caviness, J.N., Connor, D.J., Sabbagh, M.N., et al. (2008a). Reduced striatal tyrosine hydroxylase in incidental Lewy body disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 445–451.
- Beach, T.G., White, C.L., Hamilton, R.L., Duda, J.E., Iwatsubo, T., Dickson, D.W., Leverenz, J.B., Roncaroli, F., Buttini, M., Hladik, C.L., et al. (2008b). Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 277–288.

- Beach, T.G., Adler, C.H., Lue, L., Sue, L.I., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Sasse, J., Boyer, S., Shirohi, S., Brooks, R., et al. (2009). Unified Staging System for Lewy Body Disorders: Correlation with Nigrostriatal Degeneration, Cognitive Impairment and Motor Dysfunction. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 117, 613–634.
- Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C.L., Akiyama, H., Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., et al. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 689–702.
- Beach, T.G., Corbillé, A.-G., Letournel, F., Kordower, J.H., Kremer, T., Munoz, D.G., Intorcica, A., Hentz, J., Adler, C.H., Sue, L.I., et al. (2016). Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological Alpha-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects. *J. Park. Dis.*
- Beck, M., Schlabrakowski, A., Schrödl, F., Neuhuber, W., and Brehmer, A. (2009). ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence. *Cell Tissue Res.* 338, 37–51.
- Benarroch, E.E. (2007). Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69, 1953–1957.
- Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Sandroni, P., Low, P.A., and Parisi, J.E. (2006). Involvement of vagal autonomic nuclei in multiple system atrophy and Lewy body disease. *Neurology* 66, 378–383.
- Bendor, J., Logan, T., and Edwards, R.H. (2013). The Function of α -Synuclein. *Neuron* 79.
- Benskey, M.J., Perez, R.G., and Manfredsson, F.P. (2016). The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 137, 331–359.
- Berg, D., Postuma, R.B., Adler, C.H., Bloem, B.R., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C.G., Halliday, G., Joseph, L., et al. (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 1600–1611.
- Bernard, C.E., Gibbons, S.J., Gomez-Pinilla, P.J., Lurken, M.S., Schmalz, P.F., Roeder, J.L., Linden, D., Cima, R.R., Dozois, E.J., Larson, D.W., et al. (2009). Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 746-e46.
- Bertoncini, C.W., Jung, Y.-S., Fernandez, C.O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T.M., and Zweckstetter, M. (2005). Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1430–1435.
- Blandini, F., Balestra, B., Levandis, G., Cervio, M., Greco, R., Tassorelli, C., Colucci, M., Faniglion, M., Bazzini, E., Nappi, G., et al. (2009). Functional and neurochemical changes of the

- gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **467**, 203–207.
- Bloch, A., Probst, A., Bissig, H., Adams, H., and Tolnay, M. (2006). Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **32**, 284–295.
- Böttner, M., Zorenkov, D., Hellwig, I., Barrenschée, M., Harde, J., Fricke, T., Deuschl, G., Egberts, J.-H., Becker, T., Fritscher-Ravens, A., et al. (2012). Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol. Dis.* **48**, 474–480.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **4**, 2575.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2009). Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **201**, 1–119.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197–211.
- Braak, H., Müller, C.M., Rüb, U., Ackermann, H., Bratzke, H., de Vos, R.A.I., and Del Tredici, K. (2006a). Pathology associated with sporadic Parkinson's disease--where does it end? *J. Neural Transm. Suppl.* 89–97.
- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006b). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72.
- Braak, H., Sastre, M., Bohl, J.R.E., de Vos, R.A.I., and Del Tredici, K. (2007a). Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **113**, 421–429.
- Braak, H., Sastre, M., and Tredici, K.D. (2007b). Development of α -synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **114**, 231–241.
- Brandel, J.-P., Corbillé, A.-G., Derkinderen, P., and Haïk, S. (2015). [Is Parkinson's disease a prion disease?]. *Rev. Neurol. (Paris)* **171**, 812–824.
- Breydo, L., Wu, J.W., and Uversky, V.N. (2012). α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 261–285.
- Brundin, P., Ma, J., and Kordower, J.H. (2016). How strong is the evidence that Parkinson's disease is a prion disorder? *Curr. Opin. Neurol.* **29**, 459–466.

- Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A.T., and Südhof, T.C. (2013). Properties of Native Brain α -Synuclein. *Nature* 498, E4–E7.
- Campbell, B.C., Li, Q.X., Culvenor, J.G., Jäkälä, P., Cappai, R., Beyreuther, K., Masters, C.L., and McLean, C.A. (2000). Accumulation of insoluble alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. *Neurobiol. Dis.* 7, 192–200.
- Cersosimo, M.G., and Benarroch, E.E. (2008). Neural control of the gastrointestinal tract: Implications for Parkinson disease. *Mov. Disord.* 23, 1065–1075.
- Cersosimo, M.G., and Benarroch, E.E. (2012a). Autonomic involvement in Parkinson's disease: pathology, pathophysiology, clinical features and possible peripheral biomarkers. *J. Neurol. Sci.* 313, 57–63.
- Cersosimo, M.G., and Benarroch, E.E. (2012b). Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 46, 559–564.
- Cersosimo, M.G., Raina, G.B., Pecci, C., Pellene, A., Calandra, C.R., Gutiérrez, C., Micheli, F.E., and Benarroch, E.E. (2013). Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J. Neurol.* 260, 1332–1338.
- Chaudhuri, K.R., Healy, D.G., and Schapira, A.H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235–245.
- Chaumette, T., Lebouvier, T., Aubert, P., Lardeux, B., Qin, C., Li, Q., Accary, D., Bézard, E., Bruley des Varannes, S., Derkinderen, P., et al. (2009). Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 215–222.
- Cheng, H.-C., Ulane, C.M., and Burke, R.E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann. Neurol.* 67, 715–725.
- Cole, N.B., Murphy, D.D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., and Nussbaum, R.L. (2002). Lipid Droplet Binding and Oligomerization Properties of the Parkinson's Disease Protein α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* 277, 6344–6352.
- Colucci, M., Cervio, M., Faniglione, M., De Angelis, S., Pajoro, M., Levandis, G., Tassorelli, C., Blandini, F., Feletti, F., De Giorgio, R., et al. (2012). Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. *Auton. Neurosci.* 169, 77–86.
- Corbillé, A.-G., Letournel, F., Kordower, J.H., Lee, J., Shanes, E., Neunlist, M., Munoz, D.G., Derkinderen, P., and Beach, T.G. (2016). Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 35.

- Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiol. Rev.* *91*, 1161–1218.
- Costa, M. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* *47*, 15iv–19.
- Croisier, E., MRes, D.E., Deprez, M., Goldring, K., Dexter, D.T., Pearce, R.K.B., Graeber, M.B., and Roncaroli, F. (2006). Comparative study of commercially available anti- α -synuclein antibodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *32*, 351–356.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* *122* (Pt 8), 1437–1448.
- Dedmon, M.M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M., and Dobson, C.M. (2005). Mapping long-range interactions in α -synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 476–477.
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C.W., Merchant, K.M., Bezard, E., et al. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol.* *14*, 855–866.
- Del Tredici, K., and Braak, H. (2012). Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *27*, 597–607.
- Del Tredici, K., and Braak, H. (2016). Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *42*, 33–50.
- DelleDonne, A., Klos, K.J., Fujishiro, H., Ahmed, Z., Parisi, J.E., Josephs, K.A., Frigerio, R., Burnett, M., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., et al. (2008). Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch. Neurol.* *65*, 1074–1080.
- Derkinderen, P., Rouaud, T., Lebouvier, T., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and De Giorgio, R. (2011). Parkinson disease: The enteric nervous system spills its guts. *Neurol.* Novemb. 8 2011 *77*, 1761–1767.
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 13010–13015.
- Dettmer, U., Newman, A.J., Luth, E.S., Bartels, T., and Selkoe, D. (2013). In Vivo Cross-linking Reveals Principally Oligomeric Forms of α -Synuclein and β -Synuclein in Neurons and Non-neural Cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 6371–6385.
- Dettmer, U., Newman, A.J., Soldner, F., Luth, E.S., Kim, N.C., von Saucken, V.E., Sanderson, J.B., Jaenisch, R., Bartels, T., and Selkoe, D. (2015). Parkinson-causing α -synuclein missense

mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat. Commun.* 6.

- Dickson, D.W., Fujishiro, H., DelleDonne, A., Menke, J., Ahmed, Z., Klos, K.J., Josephs, K.A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J.E., et al. (2008). Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 437–444.
- Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., et al. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 8, 1150–1157.
- Duffy PE, T.V. (1965). Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neuro.*
- Edwards, L.L., Quigley, E.M., Harned, R.K., Hofman, R., and Pfeiffer, R.F. (1994). Characterization of swallowing and defecation in Parkinson's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 89, 15–25.
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239.
- Elobeid, A., Libard, S., Leino, M., Popova, S.N., and Alafuzoff, I. (2016). Altered Proteins in the Aging Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75, 316–325.
- Fauvet, B., Mbefo, M.K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M.T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., et al. (2012). α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* 287, 15345–15364.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain J. Neurol.* 114 (Pt 5), 2283–2301.
- Fereshtehnejad, S.-M., Romenets, S.R., Anang, J.B.M., Latreille, V., Gagnon, J.-F., and Postuma, R.B. (2015). New Clinical Subtypes of Parkinson Disease and Their Longitudinal Progression: A Prospective Cohort Comparison With Other Phenotypes. *JAMA Neurol.* 72, 863–873.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164.
- Fumimura, Y., Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Kanemaru, K., Sawabe, M., Arai, T., Ito, G., Iwatsubo, T., Fukayama, M., et al. (2007). Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 354–362.

- Furness, J.B. (2006). The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Auton. Neurosci.* 130, 1–5.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.
- Gai, W.P., Blumbergs, P.C., Geffen, L.B., and Blessing, W.W. (1992). Age-related loss of dorsal vagal neurons in Parkinson's disease. *Neurology* 42, 2106–2111.
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2011). A prospective study of bowel movement frequency and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 174, 546–551.
- Gelpi, E., Navarro-Otano, J., Tolosa, E., Gaig, C., Compta, Y., Rey, M.J., Martí, M.J., Hernández, I., Valldeoriola, F., Reñé, R., et al. (2014). Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 29, 1010–1018.
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., and Clayton, D.F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361–372.
- German, D.C., Manaye, K., Smith, W.K., Woodward, D.J., and Saper, C.B. (1989). Midbrain dopaminergic cell loss in parkinson's disease: Computer visualization. *Ann. Neurol.* 26, 507–514.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V.J., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2000). Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science* 290, 985–989.
- Gjerløff, T., Fedorova, T., Knudsen, K., Munk, O.L., Nahimi, A., Jacobsen, S., Danielsen, E.H., Terkelsen, A.J., Hansen, J., Pavese, N., et al. (2015). Imaging acetylcholinesterase density in peripheral organs in Parkinson's disease with 11C-donepezil PET. *Brain J. Neurol.* 138, 653–663.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., and Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 13–24.
- Goedert, M., Falcon, B., Clavaguera, F., and Tolnay, M. (2014). Prion-like Mechanisms in the Pathogenesis of Tauopathies and Synucleinopathies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 14, 495.
- Gold, A., Turkalp, Z.T., and Munoz, D.G. (2013). Enteric alpha-synuclein expression is increased in Parkinson's disease but not Alzheimer's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 237–240.
- Gómez-Tortosa, E., Newell, K., Irizarry, M.C., Sanders, J.L., and Hyman, B.T. α -Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 99, 352–357.

- Gould, N., Mor, D.E., Lightfoot, R., Malkus, K., Giasson, B., and Ischiropoulos, H. (2014). Evidence of native α -synuclein conformers in the human brain. *J. Biol. Chem.* **289**, 7929–7934.
- Gray, M.T., Munoz, D.G., Gray, D.A., Schlossmacher, M.G., and Woulfe, J.M. (2014). Alpha-synuclein in the appendiceal mucosa of neurologically intact subjects. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **29**, 991–998.
- Greene, J.G., Noorian, A.R., and Srinivasan, S. (2009). Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **218**, 154–161.
- Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A.-M., Beinis, J.-Y., Gallinari, C., Meaume, S., Piette, F., Hauw, J.-J., and Duyckaerts, C. (2006). Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch. Neurol.* **63**, 584–588.
- Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A.-M., Seilhean, D., Hauw, J.-J., and Duyckaerts, C. (2010). A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol. Aging* **31**, 99–103.
- Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 625–632.
- Guo, J.L., Covell, D.J., Daniels, J.P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., Riddle, D.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Trojanowski, J.Q., et al. (2013). Distinct α -Synuclein Strains Differentially Promote Tau Inclusions in Neurons. *Cell* **154**, 103–117.
- Hansen, M.B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* **92**, 105–113.
- Hansen, A.K., Knudsen, K., Lillethorup, T.P., Landau, A.M., Parbo, P., Fedorova, T., Audrain, H., Bender, D., Østergaard, K., Brooks, D.J., et al. (2016). In vivo imaging of neuromelanin in Parkinson's disease using 18F-AV-1451 PET. *Brain J. Neurol.* **139**, 2039–2049.
- Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.-L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., et al. (2011). α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 715–725.
- Hansen, L., Salmon, D., Galasko, D., Masliah, E., Katzman, R., DeTeresa, R., Thal, L., Pay, M.M., Hofstetter, R., and Klauber, M. (1990). The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity. *Neurology* **40**, 1–8.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007). Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 599–614.

- Hernandez, M., Hu, Y., and Kim, J.R. (2013). A conformation-switching fluorescent protein probe for detection of alpha synuclein oligomers. *Chem. Commun. Camb. Engl.* *49*, 10712–10714.
- Herva, M.E., Zibae, S., Fraser, G., Barker, R.A., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2014). Anti-amyloid Compounds Inhibit α -Synuclein Aggregation Induced by Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA). *J. Biol. Chem.* *289*, 11897.
- Hirsch, E.C., Graybiel, A.M., Duyckaerts, C., and Javoy-Agid, F. (1987). Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 5976–5980.
- Hornykiewicz, O. (1998). Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurol.* August 1998 *51*.
- Iacono, D., Geraci-Erck, M., Rabin, M.L., Adler, C.H., Serrano, G., Beach, T.G., and Kurlan, R. (2015). Parkinson disease and incidental Lewy body disease: Just a question of time? *Neurology* *85*, 1670–1679.
- Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Sakiyama, Y., Hatsuta, H., Kanemaru, K., Sawabe, M., Arai, T., Ito, G., Iwatsubo, T., et al. (2008). Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *67*, 945–953.
- Iwatsubo, T. Aggregation of α -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol.* *250*, iii11–iii14.
- Jakes, R., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* *345*, 27–32.
- Jellinger, K.A. (1991). Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem. Neuropathol. Spons. Int. Soc. Neurochem. World Fed. Neurol. Res. Groups Neurochem. Cerebrospinal Fluid* *14*, 153–197.
- Jellinger, K.A. (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J. Neural Transm. Vienna Austria* *111*, 1219–1235.
- Jellinger, K.A. (2009). Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J. Neurol.* *256 Suppl 3*, 270–279.
- Jellinger, K.A. (2011). Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J. Neurol. Sci.* *310*, 107–111.
- Jost, W.H., and Schimrigk, K. (1991). Constipation in Parkinson's disease. *Klin. Wochenschr.* *69*, 906–909.
- Jost, W.H., and Schimrigk, K. (1994). The effect of cisapride on delayed colonic transit time in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Wien. Klin. Wochenschr.* *106*, 673–676.

- Jost, W.H., and Schrank, B. (1998). Defecatory disorders in de novo Parkinsonians--colonic transit and electromyogram of the external anal sphincter. *Wien. Klin. Wochenschr.* *110*, 535–537.
- Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M., and Pearce, R.K.B. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *34*, 284–295.
- Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet* *386*, 896–912.
- Kanazawa, T., Adachi, E., Orimo, S., Nakamura, A., Mizusawa, H., and Uchihara, T. (2012). Pale neurites, premature α -synuclein aggregates with centripetal extension from axon collaterals. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *22*, 67–78.
- Kim, H.-J. (2013). Alpha-Synuclein Expression in Patients with Parkinson's Disease: A Clinician's Perspective. *Exp. Neurobiol.* *22*, 77.
- Kim, S., Jeon, B.S., Heo, C., Im, P.S., Ahn, T.-B., Seo, J.-H., Kim, H.-S., Park, C.H., Choi, S.H., Cho, S.-H., et al. (2004). α -Synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocytes in Parkinson's disease. *FASEB J.*
- Klucken, J., Ingelsson, M., Shin, Y., Irizarry, M.C., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M., Growdon, J., McLean, P., and Hyman, B.T. (2006). Clinical and biochemical correlates of insoluble alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *111*, 101–108.
- Knopman, D.S., Parisi, J.E., Salviati, A., Floriach-Robert, M., Boeve, B.F., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Dickson, D.W., Johnson, K.A., Petersen, L.E., et al. (2003). Neuropathology of cognitively normal elderly. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *62*, 1087–1095.
- Kordower, J.H., Dodiya, H.B., Kordower, A.M., Terpstra, B., Paumier, K., Madhavan, L., Sortwell, C., Steece-Collier, K., and Collier, T.J. (2011). Transfer of host-derived α synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol. Dis.* *43*, 552–557.
- Kovacs, G.G. (2016). Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* *18*, 106–108.
- Kuo, Y.M., Li, Z., Jiao, Y., Gaborit, N., Pani, A.K., Orrison, B.M., Bruneau, B.G., Giasson, B.I., Smeyne, R.J., Gershon, M.D., et al. (2010). Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated -synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1633–1650.

- Kupsky, W.J., Grimes, M.M., Sweeting, J., Bertsch, R., and Cote, L.J. (1987). Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 37, 1253–1255.
- Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., and Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 38–48.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Paillusson, S., Duyckaerts, C., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2009). The second brain and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 30, 735–741.
- Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N'Guyen, J.-M., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M., et al. (2010a). Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PloS One* 5, e12728.
- Lebouvier, T., Coron, E., Chaumette, T., Paillusson, S., Des Varannes, S.B., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2010b). Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, e11–e14.
- Lee, S.-J. (2008). Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* MN 34, 17–22.
- Lee, B.R., and Kamitani, T. (2011). Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. *PloS One* 6, e23939.
- Lesage, S., and Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* 18, R48–R59.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., et al. (2013). G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* 73, 459–471.
- Lewy, F (1912). Paralysis agitans. *Pathol. Anat. Handb. Neurol.* Vol 3 Eds Lewandowsky M Abelsdorff G 920–933 Springer-Verl. Berl. 1912.
- Li, Q.-X., Campbell, B.C.V., McLean, C.A., Thyagarajan, D., Gai, W.-P., Kapsa, R.M., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Culvenor, J.G. (2002). Platelet alpha- and gamma-synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *J. Alzheimers Dis.* JAD 4, 309–315.
- Li, Z.S., Pham, T.D., Tamir, H., Chen, J.J., and Gershon, M.D. (2004). Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1330–1339.
- Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E., and Gershon, M.D. (2006). Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor:

analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2798–2807.

Lippa, C.F., Fujiwara, H., Mann, D.M., Giasson, B., Baba, M., Schmidt, M.L., Nee, L.E., O'Connell, B., Pollen, D.A., St George-Hyslop, P., et al. (1998). Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am. J. Pathol.* 153, 1365–1370.

Lippa, C.F., Schmidt, M.L., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (1999). Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 45, 353–357.

Lue, L.-F., Walker, D.G., Adler, C.H., Shill, H., Tran, H., Akiyama, H., Sue, L.I., Caviness, J., Sabbagh, M.N., and Beach, T.G. (2012). Biochemical Increase in Phosphorylated Alpha-Synuclein Precedes Histopathology of Lewy-Type Synucleinopathies: Phosphorylated α -Synuclein and Lewy Pathology Staging. *Brain Pathol.* 22, 745–756.

Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20051–20056.

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

Luth, E.S., Bartels, T., Dettmer, U., Kim, N.C., and Selkoe, D.J. (2015). Purification of α -synuclein from human brain reveals an instability of endogenous multimers as the protein approaches purity. *Biochemistry (Mosc.)* 54, 279–292.

Lyford, G.L., He, C.-L., Soffer, E., Hull, T.L., Strong, S.A., Senagore, A.J., Burgart, L.J., Young-Fadok, T., Szurszewski, J.H., and Farrugia, G. (2002). Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut* 51, 496–501.

Ma, S.Y., R  ytt  , M., Rinne, J.O., Collan, Y., and Rinne, U.K. (1997). Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J. Neurol. Sci.* 151, 83–87.

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

Martinez-Martin, P., Rodriguez-Blazquez, C., Kurtis, M.M., Chaudhuri, K.R., and Group, on B. of the N.V. (2011). The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26, 399–406.

- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M.A., and Hasegawa, M. (2013). Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain J. Neurol.* 136, 1128–1138.
- McKeith, I.G., Dickson, D.W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J.T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J.E., Lippa, C., Perry, E.K., et al. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65, 1863–1872.
- Mehta, S.H., and Adler, C.H. (2015). Advances in Biomarker Research in Parkinson's Disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 16, 7.
- Mor, D.E., Ugras, S.E., Daniels, M.J., and Ischiropoulos, H. (2016). Dynamic structural flexibility of α -synuclein. *Neurobiol. Dis.* 88, 66–74.
- Mougenot, A.-L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., and Baron, T. (2012). Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 33, 2225–2228.
- Muntané, G., Ferrer, I., and Martinez-Vicente, M. (2012). α -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience* 200, 106–119.
- Murphy, E.M.A., Defontgalland, D., Costa, M., Brookes, S.J.H., and Wattchow, D.A. (2007). Quantification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to Hu, choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 126–134.
- Nakai, M., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Wei, J., Akatsu, H., Ohtaka-Maruyama, C., Okado, H., and Hashimoto, M. (2007). Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 104–110.
- Nalls, M.A., Pankratz, N., Lill, C.M., Do, C.B., Hernandez, D.G., Saad, M., DeStefano, A.L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., et al. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 46, 989–993.
- Narhi, L., Wood, S.J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G.M., Anafi, D., Kaufman, S.A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., et al. (1999). Both Familial Parkinson's Disease Mutations Accelerate α -Synuclein Aggregation. *J. Biol. Chem.* 274, 9843–9846.
- Natale, G., Pasquali, L., Ruggieri, S., Paparelli, A., and Fornai, F. (2008). Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 741–749.
- Natale, G., Kastsiushenka, O., Fulceri, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., and Fornai, F. (2010). MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain Res.* 1355, 195–206.

- Neunlist, M., Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P.A., Schemann, M., and Galmiche, J.P. (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52, 84–90.
- Newman, A.J., Selkoe, D., and Dettmer, U. (2013). A new method for quantitative immunoblotting of endogenous α -synuclein. *PLoS One* 8, e81314.
- Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 285, 34885–34898.
- Noorian, A.R., Taylor, G.M., Annerino, D.M., and Greene, J.G. (2011). Neurochemical phenotypes of myenteric neurons in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 519, 3387–3401.
- Noyce, A.J., Bestwick, J.P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C.H., Giovannoni, G., Lees, A.J., and Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 72, 893–901.
- Nutt, J.G. (2016). Motor subtype in Parkinson’s disease: Different disorders or different stages of disease? *Mov. Disord.* n/a-n/a.
- Olanow, C.W., Stern, M.B., and Sethi, K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1-136.
- Orimo, S., Takahashi, A., Uchihara, T., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (2007). Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson’s disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 17, 24–30.
- Orimo, S., Uchihara, T., Nakamura, A., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (2008). Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson’s disease. *Brain J. Neurol.* 131, 642–650.
- Oueslati, A. (2016). Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J. Park. Dis.* 6, 39–51.
- Oueslati, A., Fournier, M., and Lashuel, H.A. (2010). Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson’s disease pathogenesis and therapies. *Prog. Brain Res.* 183, 115–145.
- Oueslati, A., Paleologou, K.E., Schneider, B.L., Aebischer, P., and Lashuel, H.A. (2012). Mimicking Phosphorylation at Serine 87 Inhibits the Aggregation of Human α -Synuclein and Protects against Its Toxicity in a Rat Model of Parkinson’s Disease. *J. Neurosci.* 32, 1536–1544.
- Paleologou, K.E., Schmid, A.W., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fredenburg, R.A., Lansbury, P.T., Jr, Fernandez, C.O., Eliezer, D., et al. (2008). Phosphorylation at Ser-129 but

Not the Phosphomimics S129E/D Inhibits the Fibrillation of α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* 283, 16895.

Paleologou, K.E., Kragh, C.L., Mann, D.M.A., Salem, S.A., Al-Shami, R., Allsop, D., Hassan, A.H., Jensen, P.H., and El-Agnaf, O.M.A. (2009). Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain J. Neurol.* 132, 1093–1101.

Parkkinen, L., Soininen, H., and Alafuzoff, I. (2003). Regional distribution of alpha-synuclein pathology in unimpaired aging and Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 363–367.

Parkkinen, L., Kauppinen, T., Pirttilä, T., Autere, J.M., and Alafuzoff, I. (2005). Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann. Neurol.* 57, 82–91.

Parkkinen, L., Pirttilä, T., and Alafuzoff, I. (2008). Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 399–407.

Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* 35, 2180.e1-2180.e5.

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

Pearce, R.K., Hawkes, C.H., and Daniel, S.E. (1995). The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 10, 283–287.

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

Pfeiffer, R.F. (2014). Parkinson's Disease and the Gut: "The Wheel Is Come Full Circle." *J. Park. Dis.* 4, 577–578.

Phillips, R.J., Walter, G.C., Wilder, S.L., Baronowsky, E.A., and Powley, T.L. (2008). Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience* 153, 733–750.

Pimont, S., Bruley Des Varannes, S., Le Neel, J.C., Aubert, P., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2003). Neurochemical coding of myenteric neurones in the human gastric fundus. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 15, 655–662.

- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276, 2045–2047.
- Ponsen, M.M., Stoffers, D., Booij, J., van Eck-Smit, B.L.F., Wolters, E.C., and Berendse, H.W. (2004). Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 56, 173–181.
- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., Mas, N., Hofeneder, D., Brücke, T., Bayés, A., et al. (2015). The Onset of Nonmotor Symptoms in Parkinson's disease (The ONSET PDStudy). *Mov. Disord.* 30, 229–237.
- Postuma, R.B., Lang, A.E., Gagnon, J.F., Pelletier, A., and Montplaisir, J.Y. (2012). How does parkinsonism start? Prodromal parkinsonism motor changes in idiopathic REM sleep behaviour disorder. *Brain J. Neurol.* 135, 1860–1870.
- Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., et al. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 30, 1591–1601.
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., des Varannes, S.B., Rouaud, T., Roy, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2012a). A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 45, 305–309.
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Rouaud, T., Flamant, M., Toulgoat, F., Roy, M., Vavasseur, F., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., et al. (2012b). Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 893–895.
- Preterre, C., Corbillé, A.-G., Balloy, G., Letournel, F., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2015). Optimizing Western Blots for the Detection of Endogenous α -Synuclein in the Enteric Nervous System. *J. Park. Dis.* 5, 765–772.
- Proukakis, C., Dudzik, C.G., Brier, T., MacKay, D.S., Cooper, J.M., Millhauser, G.L., Houlden, H., and Schapira, A.H. (2013). A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80, 1062–1064.
- Prusiner, S.B. (2012). Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science* 336, 1511–1513.
- Prusiner, S.B., Woerman, A.L., Mordes, D.A., Watts, J.C., Rampersaud, R., Berry, D.B., Patel, S., Oehler, A., Lowe, J.K., Kravitz, S.N., et al. (2015). Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5308-5317.
- Quinn, J.G., Coulson, D.T.R., Brockbank, S., Beyer, N., Ravid, R., Hellemans, J., Irvine, G.B., and Johnston, J.A. (2012). α -Synuclein mRNA and soluble α -synuclein protein levels in post-

mortem brain from patients with Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1459, 71–80.

- Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Pérez-Villalba, A., Fernagut, P.-O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., et al. (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* 75, 351–362.
- Rizzo, G., Copetti, M., Arcuti, S., Martino, D., Fontana, A., and Logroscino, G. (2016). Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* 86, 566–576.
- Ross, G.W., Abbott, R.D., Petrovitch, H., Tanner, C.M., and White, L.R. (2012). Pre-motor features of Parkinson's disease: the Honolulu-Asia Aging Study experience. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 Suppl 1, S199-202.
- Ruffmann, C., and Parkkinen, L. (2016). Gut Feelings About α -Synuclein in Gastrointestinal Biopsies: Biomarker in the Making? *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 31, 193–202.
- Sacino, A.N., Brooks, M., Thomas, M.A., McKinney, A.B., Lee, S., Regenhart, R.W., McGarvey, N.H., Ayers, J.I., Notterpek, L., Borchelt, D.R., et al. (2014a). Intramuscular injection of α -synuclein induces CNS α -synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10732–10737.
- Sacino, A.N., Brooks, M., McKinney, A.B., Thomas, M.A., Shaw, G., Golde, T.E., and Giasson, B.I. (2014b). Brain injection of α -synuclein induces multiple proteinopathies, gliosis, and a neuronal injury marker. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 12368–12378.
- Sahay, S., Ghosh, D., Dwivedi, S., Anoop, A., Mohite, G.M., Kombrabail, M., Krishnamoorthy, G., and Maji, S.K. (2015). Familial Parkinson disease-associated mutations alter the site-specific microenvironment and dynamics of α -synuclein. *J. Biol. Chem.* 290, 7804–7822.
- Saito, Y., Ruberu, N.N., Sawabe, M., Arai, T., Kazama, H., Hosoi, T., Yamanouchi, H., and Murayama, S. (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 742–749.
- Sakakibara, R., Odaka, T., Uchiyama, T., Asahina, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, T., Yamanishi, T., and Hattori, T. (2003). Colonic transit time and rectoanal videomanometry in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 268–272.
- Sánchez-Ferro, A., Rábano, A., Catalán, M.J., Rodríguez-Valcárcel, F.C., Díez, S.F., Herreros-Rodríguez, J., García-Cobos, E., Alvarez-Santullano, M.M., López-Manzanares, L., Mosqueira, A.J., et al. (2014). In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.*

- Sauerbier, A., Jenner, P., Todorova, A., and Chaudhuri, K.R. (2016). Non motor subtypes and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *22 Suppl 1*, S41-46.
- Savica, R., Carlin, J.M., Grossardt, B.R., Bower, J.H., Ahlskog, J.E., Maraganore, D.M., Bharucha, A.E., and Rocca, W.A. (2009). Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology* *73*, 1752–1758.
- Savidge, T.C., Sofroniew, M.V., and Neunlist, M. (2007). Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *87*, 731–736.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *16 Suppl 1*, 55–59.
- Schenck, C.H., Bundlie, S.R., and Mahowald, M.W. (1996). Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* *46*, 388–393.
- Schmid, A.W., Fauvet, B., Moniatte, M., and Lashuel, H.A. (2013). Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *12*, 3543–3558.
- Schneider, S.A., Boettner, M., Alexoudi, A., Zorenkov, D., Deuschl, G., and Wedel, T. (2015). Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur. J. Neurol.* n/a-n/a.
- Schneider, S.A., Boettner, M., Alexoudi, A., Zorenkov, D., Deuschl, G., and Wedel, T. (2016). Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur. J. Neurol.* *23*, 247–261.
- Shannon, K.M., Keshavarzian, A., Dodiya, H.B., Jakate, S., and Kordower, J.H. (2012). Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *27*, 716–719.
- Singaram, C., Gaumnitz, E., Torbey, C., Ashraf, W., Quigley, E.M., Sengupta, A., and Pfeiffer, R. (1995). Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *The Lancet* *346*, 861–864.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* *388*, 839–840.
- Tamo, W., Imaizumi, T., Tanji, K., Yoshida, H., Mori, F., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Fukuda, I., Wakabayashi, K., and Satoh, K. (2002). Expression of α -synuclein, the precursor of non-amyloid β component of Alzheimer's disease amyloid, in human cerebral blood vessels. *Neurosci. Lett.* *326*, 5–8.

- Tanaka, M., Kim, Y.M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., and Mouradian, M.M. (2004). Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J. Biol. Chem.* 279, 4625–4631.
- Theillet, F.-X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H.M., Stuiver, M., Verzini, S., Lorenz, D., van Rossum, M., Goldfarb, D., et al. (2016). Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* 530, 45–50.
- Tian, Y.-M., Chen, X., Luo, D.-Z., Zhang, X.-H., Xue, H., Zheng, L.-F., Yang, N., Wang, X.-M., and Zhu, J.-X. (2008). Alteration of dopaminergic markers in gastrointestinal tract of different rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 153, 634–644.
- Tong, J., Wong, H., Guttman, M., Ang, L.C., Forno, L.S., Shimadzu, M., Rajput, A.H., Muentner, M.D., Kish, S.J., Hornykiewicz, O., et al. (2010). Brain alpha-synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a comparative investigation. *Brain J. Neurol.* 133, 172–188.
- Tretiakoff, C. (1919). Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Université de Paris.
- Uchihara, T., and Giasson, B.I. (2016). Propagation of alpha-synuclein pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 49–73.
- Uhl, G.R., Hedreen, J.C., and Price, D.L. (1985). Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35, 1215–1218.
- Ulmer, T.S., Bax, A., Cole, N.B., and Nussbaum, R.L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 280, 9595–9603.
- Uversky, V.N. (2001). Evidence for a Partially Folded Intermediate in alpha -Synuclein Fibril Formation. *J. Biol. Chem.* 276, 10737–10744.
- Uversky, V.N. (2015). Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS J.* 282, 1182–1189.
- Vaikath, N.N., Majbour, N.K., Paleologou, K.E., Ardah, M.T., van Dam, E., van de Berg, W.D.J., Forrest, S.L., Parkkinen, L., Gai, W.-P., Hattori, N., et al. (2015). Generation and characterization of novel conformation-specific monoclonal antibodies for α -synuclein pathology. *Neurobiol. Dis.* 79, 81–99.
- Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Rideout, H.J., and Stefanis, L. (2011). Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 10, 1015–1025.

- Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T., and Outeiro, T.F. (2015). Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J. Neurochem.* n/a-n/a.
- Visanji, N.P., Marras, C., Hazrati, L.-N., Liu, L.W.C., and Lang, A.E. (2014). Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 29, 444–450.
- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2011). Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71.
- Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (1997). Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 38 Suppl 2, 2–7.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., and Ikuta, F. (1988). Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 76, 217–221.
- Wakabayashi, K., Mori, F., Tanji, K., Orimo, S., and Takahashi, H. (2010). Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 1–12.
- Walker, D.G., Lue, L.-F., Adler, C.H., Shill, H.A., Caviness, J.N., Sabbagh, M.N., Akiyama, H., Serrano, G.E., Sue, L.I., and Beach, T.G. (2013). Changes in properties of serine 129 phosphorylated α -synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. *Exp. Neurol.* 240, 190–204.
- Walker, J.K., Gainetdinov, R.R., Mangel, A.W., Caron, M.G., and Shetzline, M.A. (2000). Mice lacking the dopamine transporter display altered regulation of distal colonic motility. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G311-318.
- Wang, L., Magen, I., Yuan, P.-Q., Subramaniam, S.R., Richter, F., Chesselet, M.-F., and Taché, Y. (2012). Mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 24, e425-436.
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L.T.T., Liao, J., Auclair, J.R., Johnson, D., Landeru, A., Simorellis, A.K., et al. (2011). A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17797–17802.
- Waxman, E.A., Giasson, B.I., and Duda, J.E. (2008). Characterization of antibodies that selectively detect α -synuclein in pathological inclusions. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 37–46.
- Wedel, T., Spiegler, J., Soellner, S., Roblick, U.J., Schiedeck, T.H.K., Bruch, H.-P., and Krammer, H.-J. (2002). Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 123, 1459–1467.

- Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., and Lansbury, P.T. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 13709–13715.
- Weisman, D., Cho, M., Taylor, C., Adame, A., Thal, L.J., and Hansen, L.A. (2007). In dementia with Lewy bodies, Braak stage determines phenotype, not Lewy body distribution. *Neurology* 69, 356–359.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4194–4199.
- Wiskur, B., and Meerveld, B.G.-V. (2010). The Aging Colon: The Role of Enteric Neurodegeneration in Constipation. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 507–512.
- Wong, K., Sidransky, E., Verma, A., Mixon, T., Sandberg, G.D., Wakefield, L.K., Morrison, A., Lwin, A., Colegial, C., Allman, J.M., et al. (2004). Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* 82, 192–207.
- Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.-C., Citron, M., and Biere, A.L. (1999). α -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE. *J. Biol. Chem.* 274, 19509–19512.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* 293, 321–331.
- Zarow, C., Lyness, S.A., Mortimer, J.A., and Chui, H.C. (2003). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol.* 60, 337–341.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173.
- Zhou, J., Broe, M., Huang, Y., Anderson, J.P., Gai, W.-P., Milward, E.A., Porritt, M., Howells, D., Hughes, A.J., Wang, X., et al. (2011). Changes in the solubility and phosphorylation of α -synuclein over the course of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 695–704.
- Zhu, H.C., Zhao, J., Luo, C.Y., and Li, Q.Q. (2012). Gastrointestinal dysfunction in a Parkinson's disease rat model and the changes of dopaminergic, nitric oxidergic, and cholinergic neurotransmitters in myenteric plexus. *J. Mol. Neurosci.* MN 47, 15–25.

Thèse de Doctorat

Anne-Gaëlle CORBILLE

Détection et caractérisation de l'alpha-synucléine dans le système nerveux entérique en conditions physiologiques et dans la maladie de Parkinson

Detection and characterization of alpha-synuclein in the enteric nervous system in physiological condition and in Parkinson's disease

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie du mouvement caractérisée par une neurodégénérescence de la substance noire et la présence d'inclusions d' α -synucléine (α -syn), les corps de Lewy, dans les neurones survivants. Elle se manifeste aussi par des symptômes non moteurs, dont certains, comme la constipation, surviennent précocement. La découverte que le système nerveux entérique (SNE) est fréquemment touché par la pathologie de Lewy a conduit à envisager que le tissu digestif puisse être source d'un biomarqueur précoce de la MP et que le processus pathologique de la maladie puisse s'initier dans le tube digestif pour gagner ensuite le système nerveux central par un mécanisme de type prion. L'objectif de mon travail de thèse a donc été d'optimiser la détection de l' α -syn dans le tube digestif et de comparer les propriétés de l' α -syn entérique et cérébrale. Nous avons montré que les méthodes immunohistochimiques (IHC) visant à détecter l' α -syn dans le tissu gastro-intestinal inclus en paraffine étaient limitées par des aspects techniques, mais qu'elles permettaient sur des coupes coliques avec paroi entière de détecter l' α -syn pathologique de façon performante. Puis, en utilisant une approche biochimique, nous avons montré que l' α -syn entérique native n'avait probablement pas la même tendance à s'assembler que dans le cerveau et que son niveau d'expression n'était pas modifié dans la MP. Nos travaux sont prometteurs pour la mise au point de marqueurs histologiques entériques de la MP et suggèrent une propension différente entre l' α -syn entérique et celle du cerveau à devenir pathogène.

Mots clés

Maladie de Parkinson, alpha-synucléine, système nerveux entérique, biomarqueur, immunohistochimie, modifications post-traductionnelles, cross-linking, monomère

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a movement disorder characterized by neurodegeneration in the substantia nigra and the presence of inclusions of α -synuclein (α -syn) aggregates, termed Lewy bodies, in surviving neurons. Patients may also exhibit various non-motor symptoms, such as constipation, which occur several years before the onset of motor symptoms. The discovery that the enteric nervous system (ENS) is frequently affected by Lewy pathology has led to consider the digestive tissue as a potential source for a specific PD biomarker and even to suggest that the pathological process (pathogenic α -syn) could be initiated in the gut and be propagated to central nervous system by a prion-like mechanism. The aim of my thesis was therefore (i) to optimize the detection of α -syn in the digestive tract in both physiological and pathological conditions and (ii) to compare the properties of α -syn enteric and nervous system central. In the first part, we showed that immunohistochemical methods (IHC) to detect α -syn in paraffin embedded gastrointestinal tissue were limited by some technical challenges, but when using full thickness colonic sample they allow to detect with high accuracy pathological α -syn. In the second part, using biochemical approach, we have shown that α -syn native enteric may not have the same tendency to assemble itself as in brain and its expression level was not changed in Parkinson's disease. Our results are promising for the development of enteric histological biomarkers of PD and suggest a different propensity between the enteric and brain α -syn to become pathological.

Key Words

Parkinson's disease, alpha-synuclein, enteric nervous system, biomarker, immunohistochemistry, post-translational modifications, cross-linking, monomer