

THESE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE SANTE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Neurosciences

Par **Alice PRIGENT**

Expression et agrégation des protéines α -synucléine et Tau dans le système nerveux entérique en condition inflammatoire

Thèse présentée et soutenue à NANTES, le 18 octobre 2019

Unité de recherche : INSERM UMR 1235

Rapporteurs avant soutenance :

Thierry Baron, PhD, DR, ANSES, Institut des Maladies Neurodégénératives, Lyon
Stéphane Hunot, PhD, DR, INSERM UMR 1127, Paris

Composition du Jury :

Président :	Stéphane Hunot	PhD, DR, INSERM UMR 1127, Paris
Examineurs :	Thierry Baron	PhD, DR, ANSES, Institut des Maladies Neurodégénératives, Lyon
	Stéphane Hunot	PhD, DR, INSERM UMR 1127, Paris
	Morvane Colin	PhD, MCU, INSERM UMR 1172, Lille

Dir. de thèse : Pascal Derkinderen MD, PhD, DR, PU-PH, INSERM UMR 1235, Nantes

Invité : Michel Neunlist PhD, DR, INSERM UMR 1235, Nantes

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Pascal Derkinderen. Je te remercie infiniment de m'avoir donnée ma chance en M2 et d'avoir trouvé les financements afin que je puisse effectuer ma thèse sous ta direction. Je tiens à te témoigner toute ma reconnaissance pour ces 4 années passées ensemble, pour ta vision de la science, tes connaissances inégalables dans le domaine, tes idées foisonnantes et toujours pertinentes, tes conseils, ta disponibilité à toutes heures et surtout pour l'écriture des papiers. Travailler à tes côtés a été un réel plaisir et grâce à ton enthousiasme vis-à-vis de chaque résultats, ta patience (que j'ai parfois réussi à mettre à rude épreuve), j'ai eu la chance de venir travailler chaque matin avec la même motivation et l'envie de poursuivre mes recherches.

Je tiens à remercier Michel Neunlist, pour m'avoir accueillie dès mon master 1 au sein du laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. Merci pour vos remarques et conseils toujours avisés ainsi que pour vos encouragements durant les congrès.

Je tiens également à remercier Malvyne, pour m'avoir supportée 4 ans dans le même bureau, et ce n'est pas simple. Grâce à toi, je me suis découverte une passion pour la botanique et surtout j'ai compris qu'il ne fallait pas refuser à un enfant de faire la chasse aux œufs de pâques. Merci d'avoir participé à la recherche du meilleur bo bun de Nantes, pour ces midis ubereat / tapas et vino... Blague à part, merci pour ta disponibilité, ta positivité (ça c'est l'esprit Derkin), tes encouragements, pour les soirées immuno jusqu'à 23h afin de finaliser l'article, cela va me manquer.

Un grand merci à tous les chercheurs de l'unité U1235, Malvyne, Maxime, Moustapha, Isabelle, Hélène, Sophie. Et également Philippe, pour me rappeler que l'alpha-syn n'est qu'un mythe ou une simple projection de la Sainte Vierge. Mais je dois avouer que le meilleur reste tes remèdes contre la bronchite!

Et bien sûr, un grand merci à tous les ITA, Anne, Catherine, Lisa et philippe (sans toi je n'aurais pas pu disséquer le duodénum de 50 primates). Et plus particulièrement Thibault, notre futur blotteur en herbe, pour ton aide au niveau des manips durant cette dernière année de thèse. Le prochain doctorant sera chanceux de t'avoir à ses côtés (si tu ne perds pas tes doigts d'ici là, on arrête de jouer avec l'azote!). Mais également Tony, pour sa bonne humeur inébranlable et pour m'avoir convertie à Nostalgie! Rien ne vaut des heures de dissection tous les jeudis en écoutant du Claude François ... grâce à toi j'ai enfin rangé mes écouteurs et tu rendais toutes ces matinées beaucoup plus joyeuses!

Un grand merci à tous les doctorants, les anciens et les petits nouveaux, pour l'ambiance qu'ils apportent au Labo! Jacquou, je dois avouer que cette dernière année thèse était pleine de fous rire et te voir faire des WB égayait ma journée. Ne serait-ce qu'entendre le « ploc » lorsque tes membranes tombaient sur le sol ou ta façon de plisser les yeux lors des révélations, comme si Z0-1 allait apparaître

par magie. Un grand merci pour toutes les cultures primaires de SNC, sans ton aide ces résultats n'auraient pas été possibles! Je te souhaite le meilleur pour ta fin de thèse. Ma petite Julie, je n'avais que des compliments à te faire... jusqu'à cet été, jusqu'à ce que je parte en vacances en te confiant mes quatre sublimes plantes, pour revenir et n'en voir qu'une seule en vie. Je plaisante! Un grand merci pour toutes ces soirées, les dégustations de vin, les croisières à Amsterdam, et plus simplement ta compagnie au quotidien. Je sais que tu seras en train de dompter des Kangourous pendant mon oral de thèse, mais on se revoit dans 76 jours et on fêtera tout ça! Et bien sur, merci à Camillou, mon ancienne compagne de bureau, de blindtest et de l'embuscade !

Merci à tous les anciens. Pauline, pour tes mots croisés faits maison et les multiples diplômes que tu m'as attribués. Jeremy pour ta patience, tes encouragements et les 10000 cafés que l'on a bu ensemble. Simon et Melissa, pour tous ces bons moments passés ensemble. Laurianne, je te remercie de m'avoir donnée ma chance en M1, pour ton aide et pour ta vision de la science et surtout cette passion que tu sais transmettre. Merci à tous les M2 médecins qui ont égayé nos journées et nos soirées, Marie, Farouk, Catherine, Paul, Matthieu, Justine (merci pour ta patience durant ces derniers mois de thèse), Nico (Et Dieu créa la N-Cadhérine... je croise les doigts pour ta thèse mais je te confisque le St Marc à la fleur d'oranger), Raphou (pour ces parties de pétanque improvisées dans les couloirs du labo). Arturito, t'encadrer en M2 a été un réel plaisir. Ta bonne humeur, ta rigueur, ta persévérance (mise au point des dots blots), ta motivation et tout le travail que tu as fourni ont permis de publier notre premier papier sur Tau !!

Un grand merci à tous mes amis, et plus particulièrement Noémie et Nina. Maintenant presque 20 ans d'amitié et votre soutien quotidien, vos encouragements, votre présence dans les moments difficiles (mais également les virées londoniennes, parisiennes et nantaises) m'ont été indispensables au cours de toutes ces années, durant ma thèse, et je ne vous remercierai jamais assez.

Merci à toute ma famille, et plus particulièrement mon frère, mes parents, Kaki et Marc, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée. Dad, je te remercie infiniment pour tout et également pour avoir eu le courage de relire ma thèse, tu es le meilleur!

SOMMAIRE

Remerciements.....	1
Liste des publications et conférences.....	6
Liste des abréviations	8
Introduction générale	9
I. Synucléine et Synucléinopathie	12
1.1. L'α-synucléine	12
1.1.1. Découverte et structure.....	12
1.1.2. Localisation et fonctions physiologiques	13
1.1.3. Expression de l'α-synucléine dans les neurones entériques	14
1.1.4. Modifications post-traductionnelles.....	14
1.1.5. Régulation et niveau d'expression de l'α-synucléine	15
1.1.6. Agrégation et corps de Lewy.....	17
1.2. Les principales Synucléinopathies	20
1.2.1. La maladie de Parkinson	20
1.2.2. Les démences à corps de Lewy	23
1.2.3. L'atrophie multisystématisée.....	24
II. Neuroinflammation et Synucléinopathie	25
2.1. La neuroinflammation.....	25
2.1.1. Généralités.....	25
2.1.2. Les principaux acteurs.....	25
2.2. La neuroinflammation et la maladie de Parkinson	28
2.2.1. Les analyses <i>post-mortem</i>	28
2.2.2. Etudes <i>in vivo</i> chez les patients	28
2.2.3. Les modèles neurotoxiques de la MP	29
2.2.4. LRRK2 et la neuroinflammation	29
2.2.5. L'α-synucléine et la neuroinflammation	30
2.2.6. Neuroinflammation et neurodégénérescence	31
III. La MP est une Synucléinopathie entérique	32
3.1. Le système nerveux entérique.....	32
3.1.1. Découverte et organisation	32
3.1.2. Innervation extrinsèque du SNE	33
3.1.3. Les neurones entériques.....	35
a) Les différents neurones entériques.....	35
b) Les fonctions des neurones entériques.....	36
3.1.4. Les cellules gliales entériques	38

a) Localisation et morphologie	38
b) Les fonctions des cellules gliales entériques	39
3.2. L'atteinte du SNE au cours de la MP	41
3.2.1. Les troubles gastro-intestinaux au cours de la MP	41
3.2.2. Atteinte de la barrière épithéliale intestinale.....	43
3.2.3. Altération du microbiote	43
3.2.4. Corps de Lewy et mort neuronale	44
3.2.5. L'hypothèse de Braak.....	46
IV. L'inflammation digestive et la MP	46
4.1. L'inflammation digestive au cours de MICI.....	46
4.2. Données expérimentales chez l'homme.....	47
4.2.1. Augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le TD.....	47
4.2.2. Les marqueurs fécaux de la MP	48
4.2.3. Les infections bactériennes ou virales	49
4.2.4. COX-2 et parkinson	49
4.2.5. L'appendice et parkinson.....	50
4.3. Données épidémiologiques.....	51
4.4. Données génétiques	52
4.5. Données expérimentales chez l'animal	54
V. Hypothèse et objectifs n°1	57
VI. Résultats n°1	58
ARTICLE 1 :	58
Acute inflammation down-regulates α -synuclein expression in enteric neurons.....	58
ARTICLE 2 :	71
Enteric α -synuclein expression is increased in Crohn's disease.	71
VII. Tau et tauopathies.....	77
7.1. La protéine Tau	77
7.1.1. Généralités.....	77
7.1.2. Les MAPs.....	77
7.1.3. Les différentes isoformes de Tau.....	77
7.1.4. Structure de Tau	78
7.1.5. Localisation et fonctions	79
7.1.6. La phosphorylation de Tau.....	81
7.1.7. Agrégation et facteurs d'agrégation	84
7.2. Les tauopathies	85
7.2.1. La maladie d'Alzheimer.....	85
7.2.2. La paralysie supranucléaire progressive	87

VIII. L'inflammation et les tauopathies	88
8.1. La gliose, l'astrogliose et les tauopathies	88
8.2. La neuroinflammation et tauopathies: cause ou effet ?	89
IX. Tau et SNE	91
9.1. Données expérimentales chez l'animal	91
9.2. Données expérimentales chez l'homme	92
I. Hypothèse et objectifs n°2	95
II. Résultats n°2	96
ARTICLE 1 :	96
Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy	96
ARTICLE 2 :	115
Tau is upregulated in Crohn's disease through a Nrf2/NDP52 pathway	115
III. Discussion	129
IV. Conclusion	136
V. Annexes	138
VI. Bibliographie	142

Liste des publications et conférences

PUBLICATIONS :

- Articles publiés :

Prigent, A., Lionnet, A., Durieu, E., Chapelet, G., Bourreille, A., Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., and Derkinderen, P. (2019). Enteric α -synuclein expression is increased in Crohn's disease. *Acta Neuropathol.* 137, 359–361.

Prigent, A., Gonzales, J., Durand, T., Le Berre-Scoul, C., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2019). Acute inflammation down-regulates α -synuclein expression in enteric neurons. *J. Neurochem.* 148, 746–760.

Lionnet A*, Wade MA*, Corbillé AG*, **Prigent A***, Paillusson S, Tasselli M, Gonzales J, Durieu E, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Duchalais E, Neunlist M, Perikinton MS, Hanger DP, Noble W, Derkinderen P. Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Jul 23;6(1):65.

*premiers coauteurs

- Article de revue :

Prigent, A., Lionnet, A., Corbillé, A.-G., and Derkinderen, P. (2017). Neuropathologie et physiopathologie de la maladie de Parkinson : focus sur l' α -synucléine. *Presse Med.* 46, 182–186.

- Article en préparation :

Prigent, A., Durieu, E., Bourreille, A., Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., and Derkinderen, P. (2019) Tau is upregulated in Crohn's disease through a Nrf2/NDP52 pathway

CONFERENCES :

- **Poster :**

Acute inflammation down-regulates α -synuclein expression in enteric neurons.

FNM (Federation of Neurogastroenterology and Motility) Septembre 2018 - Amsterdam, Pays-Bas.

- **Communications Orales :**

Régulation de l' α -synucléine dans le système nerveux entérique en conditions inflammatoires.

GFNG (Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie) Juin 2018 - Paris, France.

Prix de la meilleure communication orale.

L'expression de l' α -synucléine entérique est augmentée chez les patients Crohn.

IMAD (Institut des Maladies de l'Appareil Digestif) Juin 2019 - Nantes, France.

Liste des abréviations

ACh :	Acétylcholine	MPTP :	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
AGCC :	Acides gras à chaînes courtes	NFκB :	Nuclear factor-kappa B
AMS :	Atrophie Multi-Systématisée	NL :	Neurite de Lewy
BHE :	Barrière Hématoencéphalique	NOS :	Oxyde nitrique synthase
BEI :	Barrière épithéliale intestinale	PGE2 :	Prostaglandine E2
CEI :	Cellules épithéliales intestinales	PHF :	Filaments appariés en hélice
CF :	Calprotectine fécale	PM :	Plexus myentérique
CGE :	Cellules gliales entériques	PSM :	Plexus sous-muqueux
CL :	Corps de Lewy	PSP :	Paralyse Supranucléaire Progressive
COX :	Cyclooxygénase	RCH :	Rectocolite hémorragique
DCB :	Dégénérescence cortico-basale	SN:	Substance Noire
DCL :	Démence à Corps de Lewy	SNA :	Système Nerveux Autonome
DNF :	Dégénérescence Neurofibrillaire	SNC :	Système Nerveux Central
DSS :	Dextan Sodium Sulfate	SNE :	Système Nerveux Entérique
GFAP :	Glial fibrillary acidic protein	SNpc :	Substance Noire <i>Pars compacta</i>
HEL :	Human erythroblast leukemia	TD :	Tube Digestif
IFN γ :	Interféron γ	TI :	TNF-α et Il-1β
IL-1β :	Interleukine-1 β	TH :	Tyrosine Hydrolase
IL-6 :	Interleukine 6	TNF-α :	Tumor Necrosis Factor α
IPAN :	Neurones afférents primaires intrinsèques	TRIM28 :	Tripartite motif-containing 28
LRRK2 :	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>	UNGE :	Unité Neuro-Glio-Epithéliale
LPS :	Lipopolysaccharide bactérien	UPS :	Ubiquitine protéasome système
MA :	Maladie d'Alzheimer	VIP :	Vasointestinal Peptide
MAPT :	<i>Microtubule Associated Proteins</i>		
MC :	Maladie de Crohn		
MICI :	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin		
MP :	Maladie de Parkinson		

Introduction générale

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième pathologie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Cette maladie, d'expression principalement motrice, est caractérisée par une tétrade symptomatique : l'akinésie/bradykinésie, l'instabilité posturale, la rigidité musculaire et le tremblement de repos. Les deux principaux marqueurs de la MP sont la neurodégénérescence dopaminergique dans la substance noire *pars compacta* et la présence de corps et neurites de Lewy, qui sont des inclusions cytoplasmiques dont le principal composant est l' α -synucléine sous forme agrégée.

La protéine α -synucléine est neuropathologiquement et génétiquement liée à la MP. Les mutations faux sens sur le gène SNCA, codant pour l' α -synucléine, sont responsables des formes autosomiques dominantes de la MP. Le niveau d'expression de l' α -synucléine est impliqué dans le processus pathologique de la MP. En effet, les duplications et les triplications du gène SNCA ont été identifiées dans les formes familiales de la MP et une augmentation de l'ARNm de l' α -synucléine est retrouvée dans le cerveau de patients parkinsoniens comparés aux témoins. Ces résultats montrent que la simple surexpression de l' α -synucléine est suffisante pour être à l'origine d'une MP génétique et qu'une altération de son expression peut jouer un rôle critique dans le développement de cas sporadiques de la maladie.

Il est désormais bien établi que la MP n'est pas seulement une maladie du système nerveux central (SNC), mais également du tractus gastro-intestinal (GI) et plus généralement de l'axe cerveau-intestin. Les troubles digestifs sont présents chez la grande majorité des patients parkinsoniens et les agrégats d' α -synucléine, qui représentent la caractéristique neuropathologique de la MP, sont observés dans le système nerveux entérique (SNE), chez presque tous les patients examinés pathologiquement. La raison pour laquelle l' α -synucléine s'accumule dans les neurones entériques est encore débattue, mais de nombreuses études soutiennent un rôle de l'inflammation locale. Deux études menées sur des rongeurs suggèrent que l'inflammation microbienne intestinale peut favoriser l'expression/l'agrégation de l' α -synucléine. De plus, une étude récente a révélé que les biopsies duodénales de patients pédiatriques atteints d'inflammation des voies GI supérieures comportaient davantage d'immunoréactivité pour l' α -synucléine.

En ce qui concerne la MP, des niveaux d'expression plus élevés des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon, le TNF- α et l'IL-1 β , ainsi qu'une augmentation des marqueurs fécaux ont été observés chez les patients atteints de la MP comparés aux témoins. Le rôle potentiel de l'inflammation gastro-intestinale dans le développement de la MP est encore renforcé par les résultats d'une méta-analyse, regroupant les données de quatre études de grande cohorte, qui a montré une association significative entre les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et l'apparition subséquente de la MP.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient d'étudier le rôle de l'inflammation intestinale aiguë et chronique sur la régulation et l'agrégation de l' α -synucléine dans des cultures primaires de SNE *in vitro*, dans des modèles murins de souris DSS et dans des biopsies de patients MICI.

Dans la deuxième partie de thèse, nous nous sommes intéressés à une deuxième protéine neuronale, la protéine Tau. La protéine Tau associée aux microtubules se trouve principalement dans les axones des neurones, où elle existe sous forme de protéine hautement soluble qui interagit avec le cytosquelette. Six isoformes différentes de Tau sont exprimées dans le SNC humain adulte par épissage alternatif du gène MAPT, qui comprend 16 exons. L'inclusion des exons 2 et 3 donne des isoformes Tau avec 0, 1 ou 2 insertions N-terminales (0 N, 1 N, 2 N, respectivement), tandis que l'exclusion ou l'inclusion de l'exon 10 mène à l'expression d'isoformes Tau avec trois (3R) ou quatre (4R) domaines de liaison aux microtubules. On retrouve ainsi, après épissage alternatif, les six isoformes suivantes : 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R.

La fonction du Tau est fortement affectée par son état de phosphorylation, qui influence sa capacité à interagir avec les microtubules et diverses protéines de signalisation, ainsi que sa localisation et son association avec les membranes. En conditions pathologiques, des inclusions de Tau agrégée et hyper ou anormalement phosphorylée sont observées dans de nombreuses maladies neurodégénératives, regroupées sous le nom tauopathies. Les Tauopathies englobent plus de 20 pathologies, dont la maladie d'Alzheimer (MA), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la maladie de Pick, qui peuvent toutes être classées en fonction de la prédominance des isoformes Tau 3R et 4R retrouvées dans les dégénérescences neurofibrillaires. On trouve également des formes hyperphosphorylées de Tau dans d'autres maladies neurodégénératives, telle que la MP, où elle est fréquemment colocalisée avec l' α -synucléine agrégée. La neuroinflammation joue un rôle important dans le développement et le processus pathologique des tauopathies, en impactant la phosphorylation, la structure et les fonctions physiologiques de Tau.

L'étroite homologie entre le SNC et le SNE suggère qu'un processus pathologique affectant le SNC pourrait également impliquer le SNE, comme cela a déjà été décrit dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob et la MP. Quelques études ont montré que Tau est exprimée dans le tractus gastro-intestinal des rongeurs et de l'homme, mais aucune donnée n'est disponible sur le niveau d'expression et de phosphorylation des isoformes de Tau ainsi que sa régulation en conditions pathologiques dans le SNE. Il serait donc intéressant de voir si le concept de synucléinopathie entérique retrouvée dans la MP peut être étendu aux tauopathies.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient, dans un premier temps, d'étudier le niveau d'expression et de phosphorylation des isoformes de Tau *in vitro* dans des cultures primaires de SNE et SNC de rat et *in vivo* dans des biopsies coliques humaines, ainsi qu'en conditions pathologiques dans des biopsies coliques de patients atteints de la MP et PSP. Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle

de l'inflammation chronique intestinale sur la régulation de Tau entérique, dans des biopsies coliques de patients atteints de MICI.

I. Synucléine et Synucléinopathie

1.1. L'α-synucléine

1.1.1. Découverte et structure

L'α-synucléine est une petite protéine intracellulaire découverte par Maroteaux en 1988. Elle a été mise en évidence dans les vésicules synaptiques cholinergiques de l'organe électrique de la raie *Torpedo Californica*. On lui donne le nom de synucléine en raison de sa localisation subcellulaire, dans les terminaisons pré-synaptiques et dans le noyau des neurones (**nuclei**) (Maroteaux et al., 1988).

En 1997, l'α-synucléine attire de nouveau l'attention lorsque l'équipe de Polymeropoulos établit pour la première fois le lien entre des formes familiales de la maladie de Parkinson (MP) et des mutations ponctuelles situées sur le gène codant pour l'α-synucléine (Polymeropoulos et al., 1997). Durant la même année, l'équipe de Spillantini met en évidence, dans les formes sporadiques de la MP, la présence d'α-synucléine agrégée insoluble dans les corps de Lewy, inclusions cytoplasmiques caractéristiques de la MP (Spillantini et al., 1997).

Chez l'homme, cette protéine de 140 acides aminés est produite par le gène SNCA, localisé sur le chromosome 4 (4q21-q23) (Shibasaki et al., 1995). Sa séquence polypeptidique, hautement conservée entre les espèces, possède trois domaines distincts (**figure 1**) :

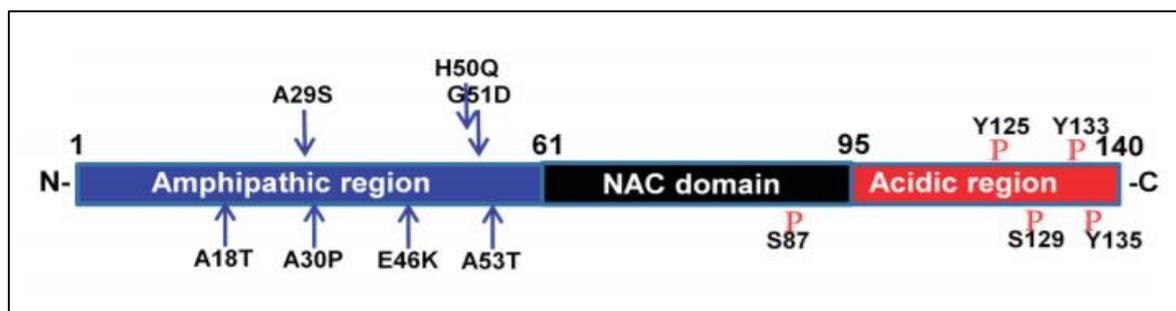


Figure 1: Séquence peptidique de l'α-synucléine. La séquence peptidique de l'α-synucléine possède 140 aa et est composée de 3 domaines distincts. Le domaine N-terminal (1-61 aa), contenant l'ensemble des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MP, une région centrale « non amyloïd component » NAC, et un domaine C-terminal riche en aa acides.

- **Un domaine N-terminal (acide aminé 1-60)** : Ce domaine contient sept répétitions imparfaites d'un motif d'acides aminés riches en lysine, similaire à ceux des lipoprotéines, qui lui confère sa structure en hélices α amphipathiques (George et al., 1995) et sa capacité à se lier aux membranes lipidiques. C'est dans ce même domaine que l'on retrouve l'ensemble des mutations présentes dans les formes héréditaires de la maladie de Parkinson.

- **Un domaine central NAC (acide aminé 61-95)** : La région Non Amyloid Component (NAC), riche en acides aminés hydrophobes, est impliquée dans le changement de conformation secondaire de

l' α -synucléine en feuillets β , et de son agrégation en fibrilles amyloïdes (Giasson et al., 2001; Ueda et al., 1993).

- **Un domaine C-terminal (acide aminé 96-140)** : Cette région, très riche en résidus acides et en proline, est chargée négativement. Elle intervient dans les interactions, la conformation et la stabilité de l' α -synucléine.

La structure secondaire de l' α -synucléine reste encore à ce jour très débattue. Certaines études montrent que, sous forme native, l' α -synucléine est un monomère soluble non structuré et non replié (Burré et al., 2013; Weinreb et al., 1996). En revanche, d'autres études suggèrent que sa forme native est un tétramère soluble et stable, replié en hélices α (Bartels et al., 2011). Sa conformation dépendrait d'un équilibre entre son état soluble et sa liaison aux membranes lipidiques. Non repliée en milieu aqueux, l' α -synucléine se replierait en hélice α lors de son interaction avec les membranes lipidiques (Bussell et al., 2005; Chandra et al., 2003).

1.1.2. Localisation et fonctions physiologiques

Dans le système nerveux central (SNC), l' α -synucléine est majoritairement exprimée dans le cortex, l'hippocampe, le striatum, le thalamus, le bulbe olfactif et le cervelet (Iwai et al., 1995). Néanmoins, son expression n'est pas limitée au SNC, puisqu'on la retrouve également dans le système nerveux entérique, le foie, les reins, le cœur (Litic et al., 2004), les cellules musculaires (Askanas et al., 2000), les cellules endothéliales (Tamo et al., 2002), ainsi que dans les plaquettes (Li et al., 2002) et les globules rouges (Nakai et al., 2007). D'un point de vue subcellulaire, l' α -synucléine est majoritairement localisée dans les terminaisons présynaptiques des neurones (Galvin et al., 2001), et des études montrent qu'elle serait également localisée dans le noyau (Maroteaux et al., 1988; Yu et al., 2007). Cependant, ces données ont rarement été retrouvées et il semblerait que sa translocation nucléaire (Kahle et al., 2000; Schell et al., 2009) soit induite par différents stimuli pathologiques et soit toxique pour les neurones (Kontopoulos et al., 2006).

Malgré sa découverte en 1988, son rôle et ses fonctions physiologiques restent encore peu connus. Toutefois, il semblerait qu'elle soit impliquée dans le trafic vésiculaire, la synthèse et le transport de dopamine, la plasticité synaptique, la biogénèse des membranes, et aurait également un rôle de protéine chaperonne. (Burre et al., 2010; Chandra et al., 2005; Clayton and George, 1998 ; Dalfó et al., 2004; George et al., 1995; Sharon et al., 2001).

1.1.3. Expression de l'α-synucléine dans les neurones entériques

Chez l'homme, dans des pièces opératoires coliques et rectosigmoïdes, l'α-synucléine est majoritairement retrouvée dans le soma et les prolongements des neurones contenus dans la sous-muqueuse et la musculuse, et très faiblement dans la muqueuse, ce qui est corrélée avec la forte expression neuronale dans les ganglions des plexus sous-muqueux et myentérique (Böttner et al., 2012, 2015). Par ailleurs, un niveau basal d'expression d'α-synucléine phosphorylée sur son résidu S129 est également détecté (Böttner et al., 2012). Dans leur deuxième papier, Böttner et al. observent, chez le rongeur, un profil similaire de l'expression du transcrite d'α-synucléine et de la synaptophysine au cours du développement post-natal. La colocalisation de ces deux protéines dans des biopsies coliques humaines suggère un rôle de l'α-synucléine dans la transmission synaptique dans le SNE.

Tant chez l'homme que chez le rongeur, les études montrent que l'expression de l'α-synucléine dans le SNE augmente au cours du développement et diminue ensuite à l'âge adulte (Böttner et al., 2015; Phillips et al., 2013). De plus, les études *in vivo* chez le rongeur montrent qu'elle est principalement exprimée dans les neurones cholinergiques et nitrergiques, et plus faiblement dans les neurones VIPergiques et TH+ (Phillips et al., 2008; Sharrad et al., 2013).

1.1.4. Modifications post-traductionnelles

L'α-synucléine est une protéine sujette à des très nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant altérer sa charge, sa structure, sa liaison aux membranes lipidiques et ses fonctions physiologiques. Une des principales modifications post-traductionnelles est la **phosphorylation** de l'α-synucléine sur son résidu sérine 129. Bien qu'il existe un niveau physiologique basal de phosphorylation sur ce résidu (estimé à 4% de la protéine totale) (Hirai et al., 2004), cette modification est relativement spécifique de sa forme agrégée retrouvée dans les corps de Lewy (Anderson et al., 2006; Fujiwara et al., 2002) (Figure 1). Cependant, son rôle pro ou anti-agrégogène reste contesté. En effet, des études suggèrent que la phosphorylation S129 favorise la formation de fibrilles (Fujiwara et al., 2002), tandis que d'autres montrent que la phosphorylation S129 et S87 empêche son agrégation (Paleologou et al., 2010; Waxman and Giasson, 2008). De même, la phosphorylation sur la tyrosine 125 serait associée à une suppression de l'agrégation et de la toxicité (Nakamura et al., 2001; Negro et al., 2002).

La nitration, l'oxydation (Norris et al., 2003; Yamin et al., 2003), l'acétylation (Bartels et al., 2014; Maltsev et al., 2012), la glycosylation (Marotta et al., 2012) et la protéolyse peuvent également altérer les fonctions physiologiques de l'α-synucléine et participer à son agrégation.

1.1.5. Régulation et niveau d'expression de l' α -synucléine

La régulation, la sécrétion et le niveau d'expression de l' α -synucléine jouent un rôle important dans le développement et l'évolution de la MP.

➤ Régulation transcriptionnelle et traductionnelle de l' α -synucléine

Dans le SNC, l'expression de l' α -synucléine augmente avec le développement et la maturation des neurones (Withers et al., 1997), ainsi qu'avec l'âge (Chu and Kordower, 2007). Des études menées par l'équipe de Stefanis se sont intéressées à l'impact de deux facteurs de croissance neuronale, le NGF et le bFGF (*basic Fibroblast growth factor*) sur la régulation transcriptionnelle de l' α -synucléine. Ils ont montré que ces deux facteurs augmentaient le niveau d'expression du transcrit en activant les régions régulatrices de l'exon 1 du gène SNCA, via une voie ERK dépendante (Clough and Stefanis, 2007). De plus, la régulation de l' α -synucléine diffère selon le sous-type de neurones. Il semblerait que, dans le SNC, le bFGF régule à la hausse l'expression de l' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques, mais pas dans les neurones GABAergiques ni corticaux (Rideout et al., 2003).

Deux autres études du laboratoire ont montré *in vitro* dans un modèle de culture primaire de SNE que la forskoline et la dépolarisation, augmentaient à la fois l'expression du messager et de la protéine α -synucléine, via une voie ERK dépendante. Les résultats ont été confirmés *in vivo*, chez des souris ayant reçu pendant trois jours des injections intrapéritonéales de forskoline ou de BAY K-8644, un activateur des canaux calciques. La sécrétion de l' α -synucléine était induite par une activation simultanée de la voie ERK et une dépolarisation des neurones, par un traitement combiné de forskoline et de veratridine, un activateur des canaux sodiques (Paillusson et al., 2010, 2013). Cela montre que les neurones entériques peuvent sécréter l' α -synucléine, et cela pourrait participer au développement et / ou à la progression de la MP.

Le facteur de transcription TRIM28 (*Tripartite motif-containing 28*, également appelé KAP1, *KRAB-associated protein-1*) est impliqué dans la régulation de l'expression de l' α -synucléine. TRIM28 entraîne la translocation et l'accumulation nucléaire de l' α -synucléine et contribue à la neurodégénérescence (Rousseaux et al., 2016). Inversement, la déplétion de TRIM28 dans des modèles murins réduit le taux d'expression de l' α -synucléine (Rousseaux et al., 2018). Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension de la régulation de l' α -synucléine et il serait intéressant de voir si l'expression de TRIM28 est régulée dans les neurones centraux et entériques au cours de la MP.

➤ Régulation de la dégradation de l' α -synucléine

La dégradation des protéines s'effectue par deux voies principales : la voie de l'autophagie et la voie du protéasome. Une dysrégulation de ces deux voies peut entraîner une accumulation et l'agrégation de l' α -synucléine.

Deux formes héréditaires de la MP sont causées par des mutations de l'ubiquitine ligase E3 (Parkine) et de l'ubiquitine carboxy-L-terminal hydrolase (UCH-L1) (Kitada et al., 1998; Leroy et al., 1998). Or, ces deux protéines sont impliquées dans la dégradation des protéines par la voie ubiquitine protéasome (Ciechanover, 1998). Par ailleurs, des sous-unités du protéasome et une immunoréactivité de l'ubiquitine sont retrouvés dans les CL de patients parkinsoniens (Li et al., 1997). Ces données suggèrent qu'une dysfonction du système ubiquitine protéasome (UPS) contribuerait à la progression de la MP. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées au système UPS dans la dégradation de l' α -synucléine mais les résultats divergent. Certaines études montrent que l'inhibition sélective des sous-unités 20S et 26S du protéasome diminue la dégradation de l' α -synucléine, et entraîne son accumulation et la formation d'agrégats (Bennett et al., 1999; McNaught et al., 2002; Tofaris et al., 2001). En revanche, ces résultats ne sont pas retrouvés par les équipes de Rideout et d'Ancolio, qui n'observent pas d'augmentation d' α -synucléine ni de formes toxiques suite à l'inhibition du protéasome (Ancolio et al., 2000; Rideout et al., 2001). De surcroît, d'autres travaux ont montré que ces dysrégulations étaient bidirectionnelles et que l' α -synucléine agrégée ainsi que les mutants pouvaient inhiber la fonction du protéasome (Lindersson et al., 2004; Snyder et al., 2003). Ainsi, il semblerait que la dysfonction du protéasome soit impliquée dans la diminution de dégradation de l' α -synucléine, l'augmentation de son accumulation et son agrégation, et que les différences de données dans la littérature soient dues à l'utilisation de différents types de lignées cellulaires et différents inhibiteurs, plus ou moins sélectif du protéasome.

L'autophagie, dépendante du lysosome, fait intervenir trois voies de dégradation des protéines : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) (Klionsky, 2007). Il a été montré que l' α -synucléine pouvait être adressée aux protéines chaperonnes pour être dégradée par la voie CMA (Mizushima et al., 2008) et également par la macroautophagie, en faisant intervenir les cathepsines L et B (protéases lysosomales), capables de cliver et dégrader l' α -synucléine (McGlinchey and Lee, 2015; Sevelever et al., 2008). De la même façon, les études ont montré que l'inhibition de la CMA et de la macroautophagie augmentait l'expression de l' α -synucléine et son accumulation intracellulaire (Paxinou et al., 2001; Vogiatzi et al., 2008).

Les études comparatives entre la voie lysosomale et la voie de l'autophagie suggèrent finalement que l' α -synucléine, sous conformation native, serait préférentiellement dégradée par le système UPS et que les formes agrégées seraient majoritairement dégradées par la voie de la macroautophagie (Webb et al., 2003), la voie des CMA ne dégradant pas efficacement les formes fibrillaires de l' α -synucléine (Cuervo et al., 2004; Martinez-Vicente et al., 2008).

➤ **Le niveau d'expression**

En parallèle des mutations ponctuelles retrouvées sur le gène SNCA, il a été montré que le taux d'expression de l' α -synucléine était également impliqué dans les formes familiales de la MP. En effet, des

duplications et triplications du gène SNCA ont été identifiées dans les formes héréditaires de la MP (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004; Singleton et al., 2003). Cette découverte a également permis de corrélérer la quantité d' α -synucléine et la sévérité de la maladie, puisque les familles ayant une triplication du gène présentent des symptômes cliniques plus sévères que celles ayant une duplication.

1.1.6. Agrégation et corps de Lewy

➤ L'agrégation de l' α -synucléine

Présente en conditions physiologiques, l' α -synucléine joue un rôle pathologique dans la MP, en raison de sa capacité à s'oligomériser et former des agrégats. Les formes physiologiques de l' α -synucléine sont en constant équilibre avec des formes intermédiaires repliées en feuillets β et partiellement conformées (Uversky et al., 2001). Ces dernières ont la capacité à former des oligomères, des protofibrilles insolubles et se polymériser en fibrilles amyloïdes, inclusions retrouvées dans les corps de Lewy (**figure 2**) (Dehay et al., 2015).

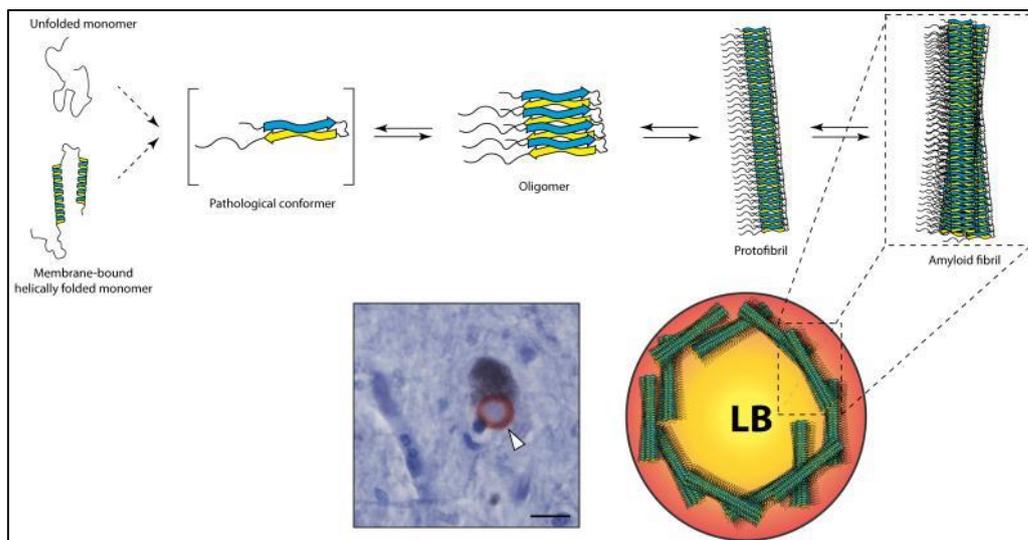


Figure 2: Schéma représentant les modifications structurales aboutissant à la formation des corps de Lewy. En condition physiologique, l' α -synucléine est retrouvée sous deux formes structurales : un monomère soluble et non replié ou sous forme de monomère replié en hélice α . Elle peut subir des modifications et adopter une structure en feuillet β , former des oligomères puis des protofibrilles insolubles et se polymériser en fibrilles amyloïdes, inclusions retrouvées dans les corps de Lewy. La photographie représente un corps de Lewy contenant l' α -synucléine agrégée. D'après (Dehay et al., 2015)

Ces défauts de repliements et l'agrégation de l' α -synucléine sont influencés par plusieurs facteurs et conditions. Tout d'abord, trois mutations ponctuelles, retrouvées sur la partie N-terminale du gène SNCA (**figure 1**) et responsables des formes héréditaires de la MP, participent à l'agrégation de l' α -

synucléine. *In vitro*, des études ont montré que les mutations A53T, E46K et H50Q accélèrent la formation de fibrilles (Conway et al., 1998; Ghosh et al., 2013; Greenbaum et al., 2005; Narhi et al., 1999) tandis que les mutations A30P, G51D et A53E diminueraient la fibrillation de l' α -synucléine et favoriseraient la formation d'oligomères (Fares et al., 2014; Ghosh et al., 2014; Li et al., 2001). Ce qui suggère que les mutations du gène SNCA ne sont pas directement liées à la pathogénicité de la MP. Toutefois, il est intéressant de noter que les souris mutées en A53T présentent des troubles gastro-intestinaux (Kuo et al., 2010) et que cette mutation entraîne l'accumulation simultanée d' α -synucléine phosphorylée sur son résidu S129 dans le SNE et le SNC, montrant des processus pathologiques parallèles entre ces deux systèmes nerveux (Bencsik et al., 2014).

Des variations physico-chimiques, telles qu'une augmentation de la température, une acidité du pH (Buell et al., 2014; Morris and Finke, 2009; Uversky, 2007), de fortes concentrations d'ions métalliques (Carboni and Lingor, 2015) d'anions et de sels (Munishkina et al., 2004) favorisent également la formation d'agrégats. De même, les facteurs environnementaux tels que l'exposition aux insecticides et herbicides, respectivement, la roténone et le paraquat, sont connus pour leurs pouvoirs agrégogènes sur l' α -synucléine (Kumar et al., 2016; Manning-Bog et al., 2002; Tanner et al., 2011). Dans un modèle de souris transgénique A53T, l'administration orale de paraquat accélère l'accumulation d' α -synucléine phosphorylée sur son résidu S129 et entraîne une microgliose dans le SNE, suggérant que l'inflammation intestinale pourrait participer au processus pathologique de la MP (Naudet et al., 2017).

Les modifications post-traductionnelles de l' α -synucléine (phosphorylation, ubiquitination, troncation, oxydation) jouent également un rôle important dans le changement de conformation secondaire et la pathogénicité de l' α -synucléine.

➤ **Les corps et neurites de Lewy**

C'est en 1912 que Friedrich Heinrich Lewy décrit pour la première fois la présence d'inclusions cytoplasmiques dans des tissus *post mortem* de patients parkinsoniens (Holdorff, 2006). En 1919, Konstantin Tretiakoff les dénomma corps et neurites de Lewy, en fonction de leur localisation dans les neurones (**figure 3**) (dans les corps cellulaires et dans les prolongements neuronaux, respectivement). Ces corps de Lewy sont les caractéristiques histopathologiques de la MP. De 1919 jusqu'à 1997, l'analyse de ces inclusions se faisait par histochimie, par coloration Hématoxyline éosine, puis, avec les progrès de l'immunohistochimie, la caractérisation de ces CL a été effectuée par marquage avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques (Fujiwara et al., 2002 ; Spillantini et al., 1997). Les CL sont majoritairement composés d' α -synucléine sous forme insoluble fibrillaire, d'ubiquitine et de neurofilaments (Baba et al., 1998; Schmidt et al., 1991; Spillantini et al., 1997).

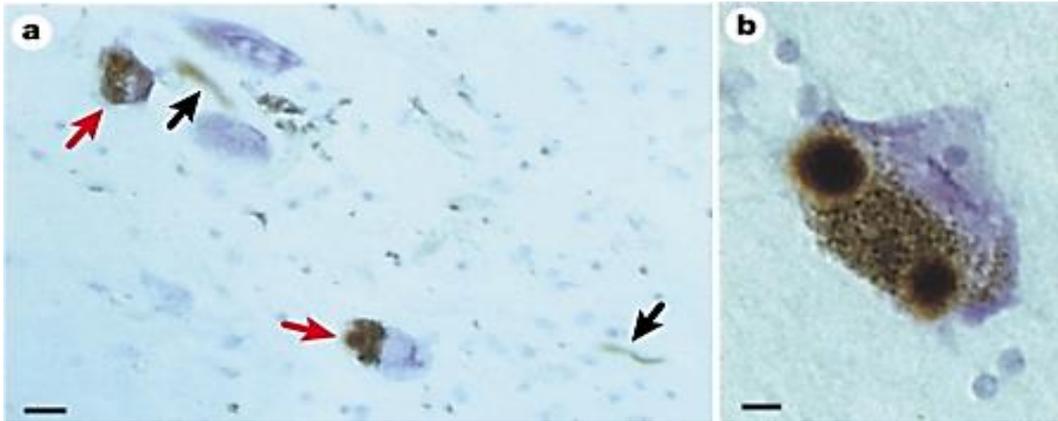


Figure 3: Corps et neurites de Lewy . A) Marquage immunohistochimique de l' α -synucléine dans le corps cellulaire (flèches rouges) et les neurites (flèches noires) des neurones de la SN d'un patient parkinsonien. Barre d'échelle : 20 μ m. B) Marquage d'un neurone contenant deux corps de Lewy α -synucléine positif. Barre d'échelle : 8 μ m. D'après Spillantini et al., 1997

➤ Toxicité des agrégats

Les formes les plus toxiques de l' α -synucléine et le rôle nocif ou protecteur des corps de Lewy restent à ce jour non élucidés. Des études suggèrent que les fibrilles amyloïdes et les corps de Lewy seraient les formes les plus toxiques puisque ces inclusions engendreraient la dégénérescence des neurones les comportant (Greffard et al., 2010a; Lu et al., 2005; Osterberg et al., 2015). D'autres études réfutent cette hypothèse en démontrant que les oligomères et les protofibrilles sont les formes les plus toxiques (Lashuel et al., 2002; Sawada et al., 2004; Winner et al., 2011) et que les inclusions fibrillaires seraient un mécanisme cytoprotecteur (Bodner et al., 2006; Tanaka et al., 2004). Ainsi, la forte toxicité des oligomères est difficilement contestable, mais des études complémentaires sont nécessaires pour statuer sur le rôle protecteur ou nocif des corps de Lewy.

1.2. Les principales Synucléinopathies

Les synucléinopathies sont l'ensemble des maladies neurodégénératives caractérisées par la présence d'inclusions contenant l' α -synucléine sous forme agrégée. Elles regroupent la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy (DCL) et l'Atrophie Multi-Systématisée (AMS). Même si ces trois maladies appartiennent au groupe des synucléinopathies, elles présentent des signes cliniques et anatopathologiques différents.

1.2.1. La maladie de Parkinson

➤ Généralités

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième pathologie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer (Nussbaum and Ellis, 2003). Cette pathologie a été décrite pour la première fois par James Parkinson en 1817, dans son ouvrage « An essay on the shaking palsy ». Premièrement qualifiée de paralysie tremblante, elle fut par la suite appelée maladie de Parkinson par Jean-Martin Charcot, qui observa que tous les patients parkinsoniens ne présentaient pas de tremblements.

Sa prévalence, augmentant avec l'âge, touche environ 1% de la population au-delà de 60 ans et plus de 4 % au-delà de 85 ans (Opara et al., 2017). La fréquence de la MP est 1,5 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Taylor et al., 2007; Wooten et al., 2004). Les causes exactes de la MP ne sont pas connues, mais elles seraient d'origines multifactorielles, incluant les facteurs environnementaux et génétiques.

➤ Signes cliniques moteurs

Cette maladie, d'expression principalement motrice, est caractérisée par une tétrade symptomatique : l'**akinésie/bradykinésie**, l'**instabilité posturale**, la **rigidité musculaire** et le **tremblement de repos** (Jankovic, 2008).

L'**akinésie et la bradykinésie** sont des atteintes des mouvements volontaires caractérisées par une diminution de l'amplitude et une lenteur des mouvements, respectivement (Berardelli et al., 2001; Giovannoni et al., 1999). Ces symptômes apparaissent au début de la MP et se traduisent par une diminution de la dextérité, une marche plus lente avec des petits pas et une hypersalivation, due à un ralentissement de la déglutition (Bagheri et al.). La **rigidité musculaire** consiste en une hypertonie musculaire qui se manifeste de façon asymétrique et unilatérale. Cela s'observe durant la marche, avec une diminution/absence du ballant d'un bras. L'**instabilité posturale** apparaît plus tardivement et est très handicapante pour les patients car elle se traduit par des chutes fréquentes (Hely et al., 2008). Le **tremblement de repos** n'est pas systématique puisqu'il n'apparaît que dans 60 à 70% des cas. Il touche

généralement la partie haute du corps, les bras et les mains, et consiste en un tremblement lorsque le patient est au repos. Ce tremblement s'arrête lorsque le patient initie un mouvement volontaire.

Tous ces symptômes ont un impact conséquent sur la qualité de vie des patients, allant d'une simple gêne à effectuer les tâches du quotidien, jusqu'aux chutes et l'incapacité à se déplacer seul.

➤ **Troubles non moteurs**

Les troubles non moteurs de la MP sont très nombreux et, dans certains cas, précèdent les troubles moteurs.

Les troubles du sommeil et de la vigilance concernent plus de 60% des patients parkinsoniens et apparaissent 10 à 20 ans avant les signes cliniques moteurs (Kalia and Lang, 2015). Ils se manifestent (de façon isolée ou associée) par des insomnies, troubles du comportement en sommeil paradoxal (TCSP), un syndrome des jambes sans repos, une somnolence diurne et des attaques du sommeil (Comella, 2007). Le TCSP se traduit par une perte du tonus musculaire et l'apparition de comportements anormaux, souvent violents, lors du sommeil paradoxal. Des études établissent un lien de causalité entre le TCSP et la MP puisque les patients atteints de TCSP présentent une diminution de l'innervation dopaminergique du striatum (Eisensehr et al., 2000; Schenck et al., 2013). De plus, il a été montré que 81% des patients initialement diagnostiqués pour un TCSP développaient une maladie neurodégénérative après 14 ans (Schenck et al., 2013), et que 38% développaient des syndromes parkinsoniens (Schenck et al., 1996).

La perte de l'odorat est un symptôme qui apparaît précocement et touche environ 45 à 90% des parkinsoniens (Haehner et al., 2009) .

Les troubles neuropsychiatriques sont fréquents et ultérieurs aux troubles moteurs. Leur sévérité est corrélée à l'évolution de la MP (Kehagia et al., 2010). Ils peuvent aller du trouble cognitif léger, **l'anxiété** et la **dépression**, jusqu'aux **hallucinations** et **démence** parkinsonienne (Aarsland et al., 2011; Marsh, 2013; Rabey, 2009; Starkstein et al., 1992). Ces troubles cognitifs sont la conséquence d'une atteinte des systèmes sérotoninergiques, cholinergiques et noradrénergiques (Aarsland et al., 2011; Kehagia et al., 2010).

L'atteinte du système nerveux autonome est observée à différents stades de la MP et se manifeste par **des troubles urinaires, digestifs et cardiovasculaires**. La dysautonomie cardiovasculaire touche environ 30 à 40% des parkinsoniens et se caractérise par une hypotension artérielle orthostatique (Jain and Goldstein, 2012). **Les troubles gastro-intestinaux** sont nombreux et apparaissent 10 à 20 ans avant le diagnostic de la MP. On retrouve trois atteintes principales, la dysphagie, la gastroparésie et la constipation, qui seront détaillées dans le chapitre 3.2.

Ces signes non moteurs, et plus particulièrement la perte de l'odorat, le TCSP et les troubles digestifs sont des signes avant-coureurs et prédictifs de la MP. Leur implication et leur potentiel rôle dans le développement de la MP restent à être élucidés.

➤ Caractéristiques anatomopathologiques

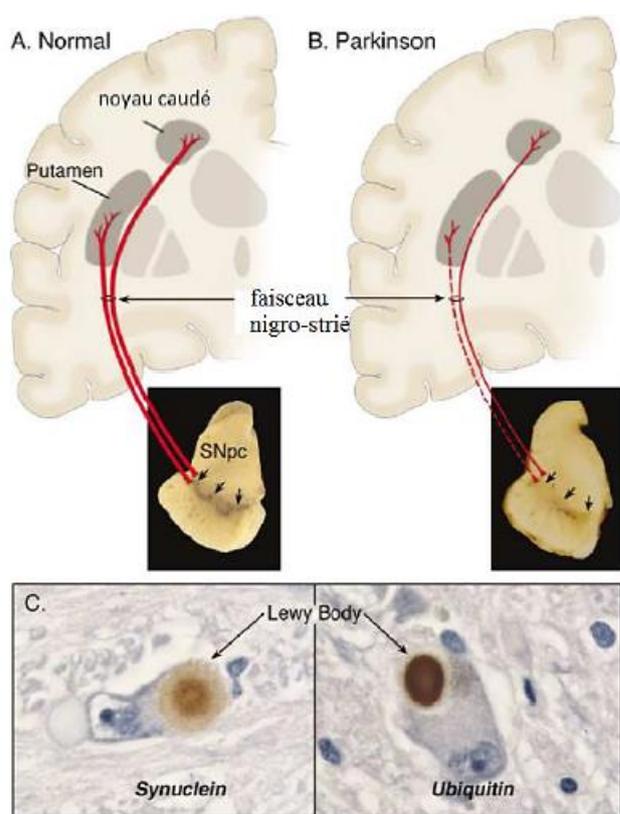


Figure 4: Atteintes du système nerveux central au cours de la maladie de Parkinson (MP). Dégénérescence de la SN et du faisceau nigro-strié (B) et formation de corps de Lewy (C) chez un patient parkinsonien.

Les signes cliniques moteurs de la MP sont la conséquence directe des lésions du mésencéphale et de **l'atteinte du système dopaminergique nigrostriatal**. On estime qu'à leur apparition plus de 30% des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) ont dégénéré. Cette mort neuronale entraîne une dénervation majeure (50 à 70%) dans les deux structures du striatum, le putamen et le noyau caudé, qui reçoivent les projections dopaminergiques issues de la SNpc via le faisceau nigro-strié (Cheng et al., 2010). Cette perte neuronale dans la SNpc est associée à la formation d'agrégats protéiques et d'inclusions cytoplasmiques hyalines dans les neurones restants nommés **corps de Lewy** (précédemment détaillés) (Holdorff, 2006) (**Figure 4**).

D'un point de vue macroscopique, la mort neuronale est accompagnée d'une dépigmentation de la SNpc, due à la perte de neuromélanine contenue dans les neurones dopaminergiques de la SNpc. Cette neurodégénérescence au sein de SNpc n'est pas homogène et elle serait plus accentuée dans sa région médio-caudale que rostro-latérale (Damier et al., 1999). Elle ferait intervenir le système ubiquitine protéasome, dont l'activité est diminuée dans la SN des parkinsoniens (McNaught and Olanow, 2003). En effet, une étude a montré qu'une injection d'inhibiteurs du protéasome par voie systémique chez le rat, entraînait en deux semaines des troubles moteurs accompagnés d'une mort neuronale par apoptose dans la SNpc (McNaught et al., 2004). Par ailleurs, des études ont montré que la sévérité des symptômes moteurs, et plus particulièrement l'akinésie et l'hypertonie, était inversement corrélée à la densité

neuronale de la substance noire mais pas à la charge lésionnelle en CL (Greffard et al., 2010b; Rinne et al., 1989).

Toutefois, les lésions au cours de la MP ne se limitent pas au système dopaminergique et touchent les systèmes noradrénergiques, cholinergiques et sérotoninergiques, et s'étendent au-delà du mésencéphale, jusqu'à certaines zones corticales (Dubois et al., 1987; Gaspar et al., 1991; Whitehouse, 1987).

➤ **Formes génétiques de la MP**

Longtemps considérée comme une maladie neurodégénérative sporadique, la MP est également une maladie génétique. Cependant, les formes familiales de la MP sont plus rares et représenteraient environ 10% des patients parkinsoniens (Corti et al., 2011).

De récentes méta-analyses d'études d'association pangénomiques ont permis d'établir le lien entre 24 loci et les facteurs de risque de la MP (Nalls et al., 2014). Cependant, seulement 15 loci sur ces 24 sont confirmés comme induisant une MP (les 9 autres étant associés à des facteurs de risque). Les mutations des gènes DJ-1, PINK1 et Parkin sont associées à une transmission autosomale récessive de la MP. En revanche, les 6 mutations présentes sur les gènes SNCA, LRRK2, VPS35, EIF4G1, DNAJC13 et CHCHD2 sont associées à une transmission autosomale dominante de la MP (Kalia and Lang, 2015).

Contrairement aux formes sporadiques, une grande majorité de ces mutations déclenchent des formes précoces de la MP, avec des évolutions lentes ou rapides, et l'apparition de signes cliniques atypiques (Verstraeten et al., 2015). En plus d'un phénotype clinique qui peut se distinguer des formes idiopathiques de la MP, il a été montré que toutes ces mutations n'entraînaient pas toujours de synucléinopathies. En effet, il semblerait que la mutation sur le gène Parkin ne soit pas systématiquement associée à la formation de CL (Miyakawa et al., 2013; Mori et al., 1998).

Toutes les études menées sur les formes héréditaires de la MP mettent en évidence une grande hétérogénéité génétique et montrent l'implication de nombreuses protéines, autres que l' α -synucléine, dont les fonctions et les mécanismes moléculaires restent actuellement non déterminés et nécessitent des études supplémentaires.

1.2.2. Les démences à corps de Lewy

La DCL est la deuxième démence la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer et représente environ 25% des démences chez les personnes âgées (Heidebrink, 2002). Il y a une grande variabilité dans les estimations de la prévalence, due à une complexité de diagnostic clinique.

Les signes cliniques de la DCL se manifestent par des syndromes moteurs parkinsoniens, des atteintes cognitives avec une fluctuation de l'attention, une diminution des facultés intellectuelles et des

hallucinations, majoritairement visuelles (McKeith et al., 1996; Outeiro et al., 2019). Tout comme pour la MP, la DCL se caractérise par la présence de CL mais leur distribution diffère entre les deux maladies. Au cours de la DCL, les CL ne sont pas uniquement retrouvés dans la SNpc et le tronc cérébral, mais également dans le système limbique, le gyrus parahippocampal, l'amygdale et le cortex (Mayo and Bordelon, 2014). La DCL peut également présenter les caractéristiques anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer, incluant la présence de plaques amyloïdes et la neurodégénérescence fibrillaire (McKeith et al., 1996). Ainsi, les fortes similarités entre les signes cliniques et les atteintes anatomopathologiques rendent le diagnostic difficile entre une démence à corps de Lewy pure et une maladie de Parkinson avec démence. La distinction s'effectue selon un critère de diagnostic qui inclue l'intervalle de temps entre l'apparition des troubles moteurs parkinsoniens et le début de la démence. Pour porter le diagnostic clinique de DCL, il faut que cet intervalle soit inférieur à un an. S'il est supérieur à un an, on parlera alors de maladie de Parkinson avec démence (Irwin et al., 2013; KOSAKA, 2014).

1.2.3. L'atrophie multisystématisée

L'AMS est une maladie neurodégénérative sporadique rare avec une progression évolutive très rapide. Elle touche environ 3 à 5 personnes sur 100 000 et survient chez les sujets entre 50 et 70 ans (Fanciulli and Wenning, 2015; Stefanova et al., 2009).

Les signes cliniques et leur sévérité diffèrent selon les patients et regroupent des symptômes parkinsoniens, des symptômes cérébelleux (incoordination de la marche et des mouvements, troubles de l'équilibre et la parole), des troubles de la dysautonomie et une dysfonction urogénitale (Gilman et al., 2008). On distingue ainsi deux sous-types des AMS en fonction de leurs symptômes prédominants. Le sous-type Parkinsonien, ou AMS-P, dont les troubles moteurs parkinsoniens prédominent, et le sous-type Cérébelleux, ou AMS-C, caractérisé par une ataxie cérébelleuse (Gilman et al., 2008).

L'une des principales caractéristiques neuropathologiques de l'AMS est la présence d'inclusions cytoplasmiques dans les oligodendrocytes, appelée inclusion cytoplasmique gliale, dont le principal composant est l' α -synucléine sous forme agrégée (Dickson et al., 1999; Papp et al., 1989). On retrouve également une atrophie dans de multiples régions cérébrales, corrélée à une perte massive de neurones et une dégénérescence axonale majoritairement dans le système olivopontocérébelleux et nigrostriatal, et dans les noyaux autonomes du tronc cérébral (Jellinger, 2014). Les autres marqueurs de l'AMS sont la perte de myéline, accompagnée d'astroglie, et une activation microgliale (Wenning et al., 2008).

L'origine de l' α -syn agrégée dans les oligodendrocytes reste non définie. Certaines études n'ayant pas observé la présence du gène SNCA dans les oligodendrocytes de patients AMS (Miller et al., 2005) suggèrent que son origine serait neuronale. En revanche, cette dernière observation a récemment été contredite par l'équipe d'Asi qui a mis en évidence, dans une étude *post-mortem*, une augmentation d'un facteur trois du niveau d'expression du gène SNCA au sein des oligodendrocytes de patients AMS (Asi et

al., 2014). Cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour savoir si cette augmentation du messenger dans les oligodendrocytes est suffisante pour entraîner l'agrégation de l' α -synucléine, ou si elle est neuronale puis recaptée par les oligodendrocytes.

II. Neuroinflammation et Synucléinopathie

2.1. La neuroinflammation

2.1.1. Généralités

L'inflammation est une réponse adaptative des tissus vascularisés suite à une agression d'origine chimique, physique ou une infection. On parle de neuroinflammation lorsque cette inflammation touche le système nerveux central et la moelle épinière, et fait intervenir à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative (DiSabato et al., 2016). Longtemps considéré comme un organe immunoprivilégié et à l'abri des agressions grâce à la barrière hématoencéphalique (BHE), il est désormais bien établi que le SNC à son propre système immunitaire et est le lieu de réactions neuroinflammatoires (Galea et al., 2007; Louveau et al., 2015). Suite à une agression, les cellules immunitaires du SNC sont activées via leur récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PPR), initient la réponse immunitaire en produisant des médiateurs de l'inflammation et induisent la neuroinflammation (Galic et al., 2012). Cette neuroinflammation est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les accidents vasculaires, les traumatismes crâniens mais également dans les maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Amor et al., 2010).

2.1.2. Les principaux acteurs

➤ La microglie

Dans le système nerveux central, les cellules gliales représentent plus de 50% des cellules totales et sont retrouvées selon quatre types : les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes et les cellules NG2 (Azevedo et al., 2009; Jessen, 2004). Les cellules microgliales, qui représentent 10% des cellules gliales dans le SNC, sont des macrophages qui représentent la première ligne de défense immunitaire du SNC (Perry, 1998). En cas d'inflammation, la microglie s'active rapidement et change de phénotype. Elle peut adopter un profil pro-inflammatoire M1, en augmentant à sa surface l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité II (CMH), de CD 60 et CD86, et ainsi produire des médiateurs cytotoxiques et immunomodulateurs tels que des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, l'expression de iNOS (inducible nitric oxide synthase) et de COX 2 (cyclooxygénase)-2, des radicaux libres (Perry et al., 2010; Barakat and Redzic, 2016). Ce phénotype M1 augmente l'inflammation et participe à la disruption de la BHE. A l'inverse, le phénotype M2 est caractérisé par l'expression des marqueurs CD206 et CD36 à

sa surface, et par sa réponse anti-inflammatoire et neuroprotectrice (production de médiateurs et cytokines anti-inflammatoires) (**figure 5**). Ainsi, en cas d'inflammation la microglie assure les fonctions de phagocytose, présentation d'antigène et la réponse inflammatoire. Cependant, l'activation de la microglie peut, à cause de sa production de radicaux libres, de dérivés toxiques de l'oxygène et des métalloprotéases, entraîner des lésions secondaires et contribuer au développement de maladies neurodégénératives (Perry et al., 2010).

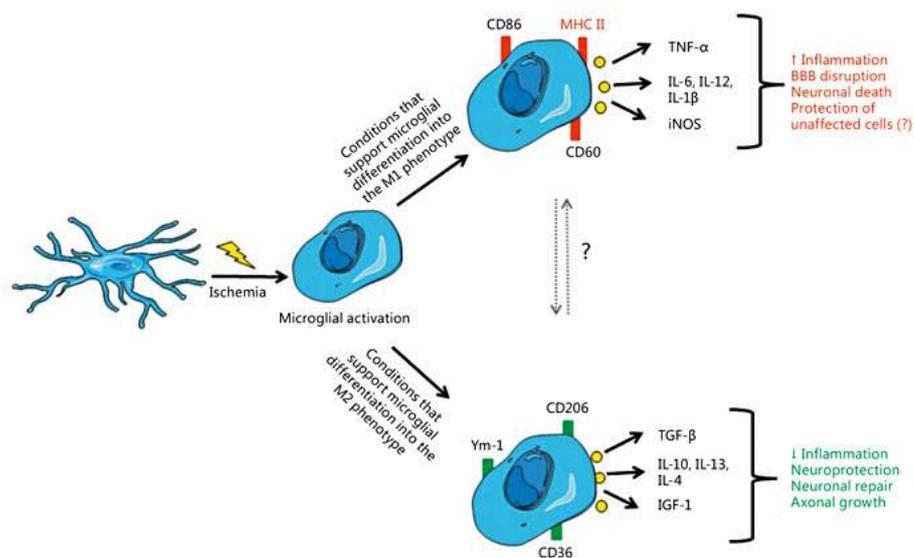


Figure 5 : Schéma résumant l'activation et la polarisation microgliales après un événement pathologique. Suite à différents stimuli, la microglie peut adopter un profil pro-inflammatoire M1 ou anti-inflammatoire M2 et participer à la réponse pro ou anti-inflammatoire, respectivement. D'après Barakat and Redzic, 2016

➤ Les astrocytes

Les astrocytes représentent la majorité des cellules gliales et sont présents de façon ubiquitaire dans toutes les régions du SNC (Sofroniew and Vinters, 2010). Ils ont de nombreux prolongements interconnectés directement avec les neurones voisins et les vaisseaux sanguins de la BHE, afin de former un réseau fonctionnel via des gap junctions (Sofroniew and Vinters, 2010). Ce sont donc des cellules qui assurent le soutien et la protection des neurones, régulent l'activité neuronale, participent à l'intégrité et à la perméabilité de la BHE ainsi qu'à la régulation du flux sanguin (Sofroniew and Vinters, 2010). Ils sont également impliqués dans la réponse immunitaire et la neuroinflammation. En cas d'agression, les astrocytes assistent la microglie dans sa défense immunitaire, en adoptant un phénotype pro-inflammatoire, on parle alors d'astrogliose. Les principaux marqueurs de cette astrogliose réactive sont l'augmentation de l'expression de la GFAP (Takano et al., 2005), de la vimentine, et une hypertrophie des astrocytes (Hol and Pekny, 2015; Lewis and Fisher, 2003; Yang and Wang, 2015). Les astrocytes ont de nombreux récepteurs à leur surface, leur permettant de percevoir de multiples stimuli, entraînant l'activation de cascades signalétiques. Suite à ces différents stimuli, les astrocytes deviennent activés et

peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires (Brambilla et al., 2005, 2009), des dérivés réactifs de l'oxygène (Hamby et al., 2006; Swanson et al., 2004), du glutamate (Takano et al., 2005), et compromettre l'intégrité de la BHE via la production de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Argaw et al., 2009). Comme pour la microglie, les astrocytes, de par leur production de NO et ROS (Dong and Benveniste, 2001), peuvent contribuer aux lésions cérébrales secondaires.

➤ **Les oligodendrocytes**

Les oligodendrocytes, dont les précurseurs sont les cellules NG2, ont pour principal rôle de former la gaine de myéline des axones des neurones du SNC et de participer au développement et à la survie des neurones (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Frühbeis et al., 2013; Wake et al., 2011). Cependant, ils interviennent également dans la réponse inflammatoire. Ils peuvent exprimer à leur surface les CMH II (Saikali et al., 2007; Zaguia et al., 2013), intervenant dans la présentation d'antigène, et les TLR2 et TLR3 (Bsibsi et al., 2002; Sloane et al., 2010), permettant la reconnaissance de leur ligand spécifique et l'activation des oligodendrocytes. En réponse à ces stimuli, ils produisent de nombreuses chimiokines (Balabanov et al., 2007) et cytokines pro-inflammatoires (Cannella and Raine, 2004; Ramesh et al., 2012), induisant l'activation de la microglie et des macrophages.

➤ **Les cellules immunitaires périphériques**

En conditions physiologiques, les cellules immunitaires périphériques telles que les lymphocytes T et B sont difficilement détectables dans le SNC. Suite à une infection ou une lésion cérébrale, les leucocytes vont, grâce à leurs molécules d'adhésion (Greenwood et al., 2011), adhérer à l'endothélium et migrer au travers des capillaires sanguins vers les espaces périvasculaires via leur production de chimiokines (Reboldi et al., 2009; Ubogu et al., 2006). Cette infiltration des neutrophiles puis des lymphocytes va activer les cellules du parenchyme, qui vont produire des médiateurs pro-inflammatoires, modifier la perméabilité de la BHE et entraîner le passage des leucocytes dans le parenchyme. Cependant, cette infiltration leucocytaire peut être néfaste pour les tailles lésionnelles (Becker et al., 2001; Yenari et al., 1998), et les cellules du parenchyme limitent leur présence dans le tissu interstitiel ou les réorientent vers des phénotypes plus immunorégulateurs (produisant des cytokines anti-inflammatoires).

2.2. La neuroinflammation et la maladie de Parkinson

2.2.1. Les analyses *post-mortem*

Les premières découvertes de la neuroinflammation chez les parkinsoniens ont été observées il y a plus de 30 ans, au cours d'analyses *post-mortem*. McGeer et al. ont rapporté la présence d'antigène HLA-DR, un CMH de classe II, sur la microglie réactive dans la SNpc des patients (McGeer et al., 1988). Parallèlement, l'augmentation de nombreux médiateurs de l'inflammation, qui peuvent être sécrétés par la microglie activée, ont été retrouvés dans différentes régions cérébrales des parkinsoniens. Tout d'abord, une augmentation de l'expression des chimiokines CXCL12 et de son récepteur CXCR4 a été retrouvée sur les neurones dopaminergiques des parkinsoniens comparés aux contrôles, malgré la perte neuronale dopaminergique chez les patients (Shimoji et al., 2009). D'autres études ont montré un taux plus élevé de cytokines pro-inflammatoires, et plus précisément l'IL-6, l'IL-2, l'IL-1 β et le TNF- α dans le striatum, et le TNF- α , l'IL-1 β , IFN- γ , oxyde nitrique synthase (NOS) et des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans la SN et le liquide cébrospinal de parkinsoniens comparés aux témoins (Hunot et al., 1999; Mogi et al., 1994a, 1994b, 1994c, 1996). Ces données confirment l'implication de la microglie activée dans les processus inflammatoires, au niveau des régions cérébrales touchées lors de la MP.

Cependant, la microglie n'est pas la seule glie impliquée puisque les astrocytes participent également à la neuropathologie de la MP (Damier et al., 1993). On retrouve, chez les parkinsoniens, une augmentation du nombre d'astrocytes dans la SN, ainsi qu'une augmentation du marqueur S100 β exprimé par ces derniers (Bianchi et al., 2007; Damier et al., 1993). S100 β pourrait accroître l'expression d'iNOS, qui en réponse activerait l'enzyme pro-inflammatoire COX-2 (cyclooxygénase 2) dans la microglie et la production de NO et de radicaux libres (Bianchi et al., 2007; Gomes et al., 2008). Ces événements peuvent participer directement ou indirectement à la neurodégénérescence. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer le rôle exact des astrocytes dans la mort neuronale au cours de la MP.

2.2.2. Etudes *in vivo* chez les patients

En parallèle des études *post-mortem*, de nombreuses études du vivant du patient ont également retrouvé une augmentation de l'IL-6, l'IL-2, l'IL-1 β , IFN- γ , le TNF- α et l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) dans le plasma et le sérum, ainsi que l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α dans le liquide cébrospinal des parkinsoniens (Blum-Degen et al., 1995; Brodacki et al., 2008; Mogi et al., 1994a).

Outre les cytokines pro-inflammatoires, l'expression du MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*), une cytokine inhibant la migration des macrophages, est également augmentée (Nicoletti et al., 2011). Le MIF est impliqué, entre autres, dans l'activation de cellules T (Bacher et al., 1996). Une diminution du taux de lymphocytes B et lymphocyte T *helper* est rapportée tandis que le nombre de lymphocyte T activés est augmenté, ce qui suggère également une activation immunitaire périphérique

au cours de la MP (Bas et al., 2001). De façon similaire aux lymphocytes T activés, on retrouve un taux plus élevé des lymphocytes T régulateurs mais qui présentent des dysfonctions et une perte de leur activité suppressive (Bas et al., 2001; Rosenkranz et al., 2007; Saunders et al., 2012).

2.2.3. Les modèles neurotoxiques de la MP

Les deux principaux modèles neurotoxiques de la MP sont le modèle au 6-OHDA (6-hydroxydopamine) et le modèle au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine). Le 6-OHDA est une neurotoxine, ne passant pas la barrière hématoencéphalique, que l'on injecte classiquement dans la SNpc et qui entraîne une lésion massive dans les corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la SN (Blandini et al., 2008). Dans des modèles murins de la MP, l'injection de 6-OHDA entraîne une activation de la microglie dans la SN (Akiyama and McGeer, 1989; He et al., 2001) ainsi qu'une réactivité des astrocytes dans la SN et le striatum (Rodrigues et al., 2001). Par ailleurs, le rôle de l'inflammation dans la neurodégénérescence au 6-OHDA a également été mis en évidence par McCoy et al., en observant que, suite à l'exposition au 6-OHDA, l'inhibition du TNF- α dans la SNpc diminuait la neurodégénérescence nigrostriatale (McCoy et al., 2008). De la même manière que pour le 6-OHDA, le traitement au MPTP, une neurotoxine qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries, induit une activation de la microglie et des astrocytes dans des modèles murins et primates de la MP (Liberatore et al., 1999; McGeer et al., 2003). L'étude de Brochard et al. a également montré, dans des analyses *post-mortem* de patients ou dans des modèles murins d'intoxication au MPTP, une infiltration nigrostriatale des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Brochard et al., 2009). De plus, ils ont observé dans deux modèles murins immunodéficients Rag1^{-/-} et Tcrb^{-/-}, n'exprimant pas les LT matures ou les récepteurs aux cellules T respectivement, une forte diminution de la neurodégénérescence induite par le MPTP (Brochard et al., 2009). Ces modèles au MPTP ont mis en évidence que l'activation de la microglie et la production de cytokines pro-inflammatoires précédaient la neurodégénérescence, ce qui suggère qu'ils participent et même induisent la neurodégénérescence (Brochard et al., 2009; Liberatore et al., 1999; McGeer et al., 2003). Toutefois, il est intéressant de noter que, l'injection de MPTP chez des souris KO n'exprimant pas l' α -synucléine, n'entraîne pas de neurodégénérescence dopaminergique dans la SN (Dauer et al., 2002), ce qui suggère un rôle important de l' α -synucléine lors de la mort neuronale nigrostriatale médiée par MPTP.

2.2.4. LRRK2 et la neuroinflammation

Au cours de la MP, les mutations sur le gène LRRK2 (*leucine rich repeat kinase 2*) sont les plus fréquentes, représentant environ 4% des formes héréditaires de la MP, et 1% des formes sporadiques (de Rijk et al., 2000). LRRK2 code pour une large protéine à multidomaines, qui est impliquée dans de

multiples processus cellulaires tels que la pousse neuritique, la morphogénèse des synapses, le trafic vésiculaire, l'autophagie, la synthèse de protéines et aurait un rôle dans la réponse immunitaire innée (Civiero et al., 2018; Cookson, 2012; Dzamko and Halliday, 2012; Lee et al., 2012; Sanna et al., 2012). L'activité de la protéine LRRK2 lui est en partie conférée par ses fonctions enzymatiques, GTPase and sérine-thréonine kinase. Cette protéine a également été identifiée comme un acteur de l'activation intrinsèque de la microglie et de la dégradation autophagolysosomale (Higashi et al., 2009). L'expression de LRRK2 est plus élevée dans les monocytes et la microglie que dans les neurones, ce qui renforce l'implication de LRRK2 dans la réponse immunitaire.

Des stimuli, comme une infection au LPS, sont connus pour activer leurs récepteurs TLR4 à la surface de la microglie. De plus, dans des cultures primaires de monocytes et microglie, la stimulation des TLR2 et TLR4 induit une augmentation de l'expression de LRRK2 et de sa phosphorylation (Gardet et al., 2010; Schapansky et al., 2014). Ces résultats sont retrouvés dans des cultures primaires de microglie où un stimulus au LPS augmente l'expression de LRRK2 (Moehle et al., 2012) tandis que, dans un modèle murin KO pour LRRK2, le traitement au LPS induit une diminution de la production de TNF- α et iNOS et une diminution de l'activité de la voie NF κ B (Kim et al., 2012). Ces résultats montrent que LRRK2 pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire, et suggèrent une participation de LRRK2 à la progression de la MP via l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires.

Par ailleurs, LRRK2 joue un rôle important dans l'inflammation périphérique. On le retrouve en grande quantité dans les PBMC, la moelle osseuse et les macrophages. Dans des modèles murins de colite intestinale, les souris n'exprimant pas LRRK2 présentent une inflammation et des symptômes accrus comparées aux souris non délétées pour LRRK2 (Liu et al., 2011), indiquant un rôle important de LRRK2 dans l'inflammation périphérique, et une possible implication lors de la MP.

2.2.5. L' α -synucléine et la neuroinflammation

De nombreux modèles de la MP utilisent des souris transgéniques, délétées ou surexprimant l' α -synucléine, ou induisant des mutations. Watson et al. ont étudié la distribution de microglie activée, l'infiltration lymphocytaire et la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle transgénique murin surexprimant l' α -synucléine humaine (Watson et al., 2012). Ils ont observé une augmentation du nombre de microglie activée et un taux plus élevé de TNF- α (ARNm et protéine) premièrement dans le striatum puis dans la SN, mais aucune atteinte n'a été retrouvée dans le cortex ni le cervelet. L'activation de la microglie persistait après 14 mois tandis que la forte concentration de TNF- α dans le sérum n'était détectée que jusqu'à 6 mois. Dans la SN, une augmentation de l'expression des TLR 4 et TLR 8, des médiateurs de l'activation microgliale, était tout d'abord observée chez les souris âgées de 5-6 mois, puis un taux plus élevé de TLR2 après 14 mois. Parallèlement, une inflammation périphérique, incluant une augmentation de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans le sérum, était observée uniquement à

22 mois, suggérant une réponse immunitaire adaptative plus tardive. Ces résultats montrent, malgré des taux plus élevés d' α -synucléine dans d'autres régions cérébrales, une réponse inflammatoire sélective des régions contenant les corps cellulaires et les axones de la voie nigrostriée, suggérant la vulnérabilité spécifique de cette voie au cours de la MP. Su et al. ont confirmé l'augmentation de l'activation microgliale et du TNF- α dans la SN, également dans un modèle transgénique murin surexprimant l' α -synucléine humaine. De même, leurs résultats suggèrent un rôle précurseur de l' α -synucléine et de l'inflammation dans le processus pathologique de la MP (Su et al., 2008). De façon similaire, l'activation de la microglie dans la SN est retrouvée, *in vivo*, chez des souris exprimant des formes tronquées de l' α -synucléine (Gerfen et al., 2002).

L' α -synucléine peut adopter plusieurs conformations et souches, présentant différentes structures et traits phénotypiques (Bousset et al., 2013; Peelaerts et al., 2015). Ainsi, des études se sont interrogées sur l'impact de ces différentes formes de l' α -synucléine sur la progression de la MP, et leurs interactions avec le système immunitaire. Des injections d' α -synucléine recombinante monomérique directement dans la SN, entraînent une augmentation significative de l'expression de l'IL-6 et de COX 2 (tendance à l'augmentation pour l'IL-6 et le TNF- α), du marqueur d'activation de la microglie (iba-1) et des marqueurs endothéliaux de l'inflammation dans la SN (Couch et al., 2011). Ces résultats sont également retrouvés suite à une injection dans le striatum, avec de surcroît, une augmentation de la GFAP, traduisant une réactivité des astrocytes (Sznejder-Pachołek et al., 2017). Pareillement, l'injection de protofibrilles d' α -synucléine dans la SN des rats active fortement la microglie, en faisant intervenir les voies des MAP kinases et NFkB (Wilms et al., 2009). Plus récemment, Harms et al. ont observé, suite à une injection des formes fibrillaires d' α -synucléine dans la SNpc, une induction des CMH II, un recrutement périphérique des macrophages et des monocytes sur le site d'injection, puis, une propagation dans le striatum, accompagnée d'inclusions cytoplasmiques et d'une perte de neurones TH dans le striatum (Harms et al., 2017). Ces résultats supportent l'hypothèse d'un recrutement périphérique des cellules immunitaires, précédant la neurodégénérescence.

2.2.6. Neuroinflammation et neurodégénérescence

Les différentes études citées précédemment mettent en avant la survenue d'une neuroinflammation centrale ainsi qu'un recrutement des cellules immunitaires périphériques au cours de la MP. Et certaines équipes mettent en évidence un lien de causalité entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence. En effet, il semblerait que, dans plusieurs modèles, l'activation microgliale, l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la voie NFkB précédaient la mort neuronale, montrant que la neuroinflammation participait à la dégénérescence dopaminergique dans la SN (**figure 6**). Ainsi, il serait proposé, au cours de la MP, que des facteurs environnementaux, l'agrégation de l' α -synucléine, ainsi qu'une infiltration périphérique activeraient la microglie. En réponse, cette

dernière libèrerait des médiateurs inflammatoires qui activeraient soit directement les neurones, soit les astrocytes réactifs. Et que cette inflammation, médiée par la microglie et les astrocytes, libèrerait des substances neurotoxiques et aboutirait à la dégénérescence des neurones (**figure 6**) (Wang et al., 2015).

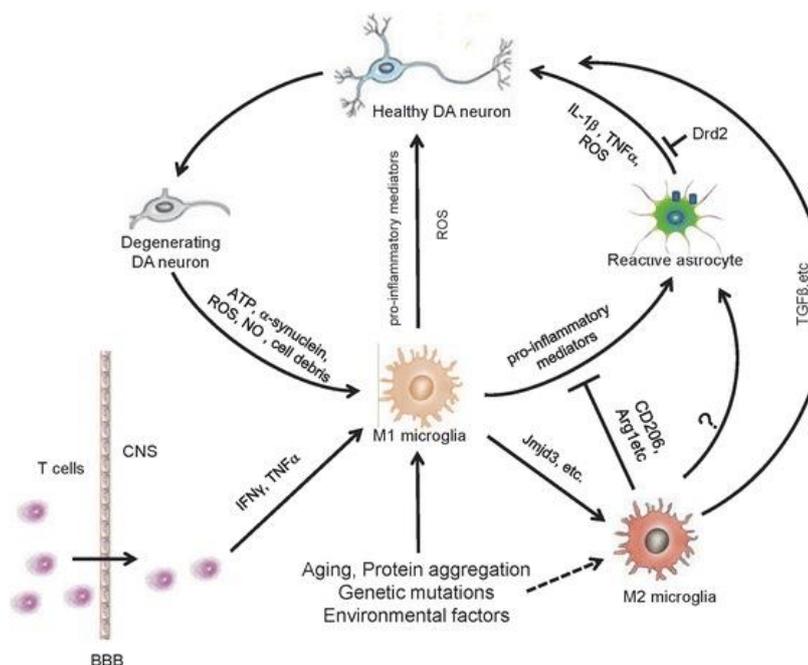


Figure 6 : Schéma représentant les mécanismes inflammatoires impliqués au cours de la MP. L'agrégation des protéines, les mutations génétiques, les facteurs environnementaux peuvent activer la microglie, qui en réponse va adopter un phénotype M1 pro-inflammatoire. Les médiateurs pro-inflammatoires des microglies M1 activent les astrocytes, conduisant à une production élevée de facteurs proinflammatoires, d'oxyde nitrique et des dérivés réactifs de l'oxygène, contribuant à la dégénérescence des neurones DA. Les molécules libérées par les neurones DA dégénératifs peuvent provoquer une activation supplémentaire des glies et une réponse inflammatoire accrue. À un certain stade de la MP, la sous-population de microglies peut adopter un phénotype M2 libérant des facteurs anti-inflammatoires, y compris TGF-β, et exercer un effet neuroprotecteur dans la MP. D'après (Wang et al., 2015)

III. La MP est une Synucléinopathie entérique

3.1. Le système nerveux entérique

3.1.1. Découverte et organisation

Le système nerveux entérique (SNE) est un système nerveux autonome et intégratif qui s'étend du tiers supérieur de l'œsophage jusqu'au rectum et est présent dans les glandes digestives annexes telles que les glandes salivaires, le pancréas et la vésicule biliaire (Furness, 2012; Hansen, 2003a). Le SNE est un réseau ganglionnaire composé d'environ 200 à 600 millions de neurones et 5 à 10 fois plus de cellules gliales entériques (Furness et al., 2014). Il contrôle les principales fonctions digestives, telles que la motricité digestive et les fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) (Goyal and Hirano, 1996; Hansen, 2003b). Bien qu'il soit relié au système nerveux autonome, il fonctionne de façon indépendante. En effet, des expériences menées par Bayliss et Starling ont permis d'observer, après vagotomie chez le chien et le lapin, une fonction intacte du péristaltisme et des contractions spontanées de l'intestin et du côlon isolés (Bayliss and Starling). Cependant, même si le SNE fonctionne de façon autonome, le SNC influence et régule ses fonctions gastro-intestinales.

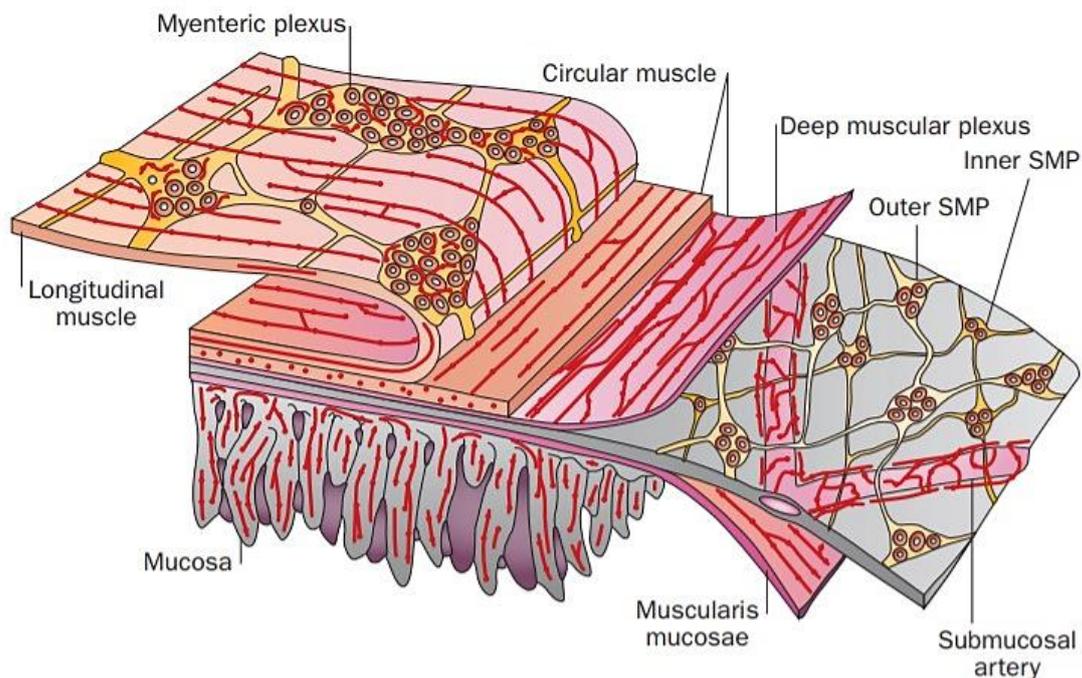


Figure 7 : Organisation anatomique du système nerveux entérique. Le SNE entérique est composé de deux principaux plexus : le plexus myentérique localisé entre les deux couches musculaires longitudinale et circulaire, et le plexus sous-muqueux localisé entre la muqueuse et la couche musculaire circulaire. D'après Furness et al., 2012.

Le SNE s'organise en deux plexus majeurs : le plexus myentérique (d'Auerbach) et le plexus sous-muqueux (de Meissner). Ces derniers forment un réseau dense de neurones et de cellules gliales interconnectés et regroupés sous forme de ganglions reliés entre eux par des fibres interganglionnaires. Le plexus sous-muqueux, situé entre la muqueuse et les fibres musculaires lisses circulaires, contrôle les fonctions de la muqueuse digestive (sécrétion, absorption, perméabilité, réparation) ainsi que le flux sanguin et les fonctions immunitaires (Hansen, 2003b) (**figure 7**). Chez l'homme, ce dernier est divisé en trois plexus: le plexus de Meissner, le plexus de Schabadasch, accolé à la couche musculaire lisse circulaire, et un plexus intermédiaire situé entre ces deux derniers (Timmermans et al., 1997). Le plexus myentérique, situé entre la couche musculaire lisse circulaire et la couche musculaire lisse longitudinale, régule la motricité digestive (Furness, 2012; Hansen, 2003b).

3.1.2. Innervation extrinsèque du SNE

Les fonctions gastro-intestinales, assurées par le SNE, sont également régulées par les innervations du système nerveux autonome (SNA). En effet, le SNE et le SNC communiquent entre eux par l'intermédiaire des afférences et des efférences du SNA. L'innervation extrinsèque du tube digestif

comprend les innervations sympathiques et parasympathiques. Ainsi, les messages nerveux provenant du SNC sont transmis tout au long de tractus digestif par trois voies : la voie vagale, la voie sympathique et les voies sacrées (ou pelviennes) (**Figure 8**).

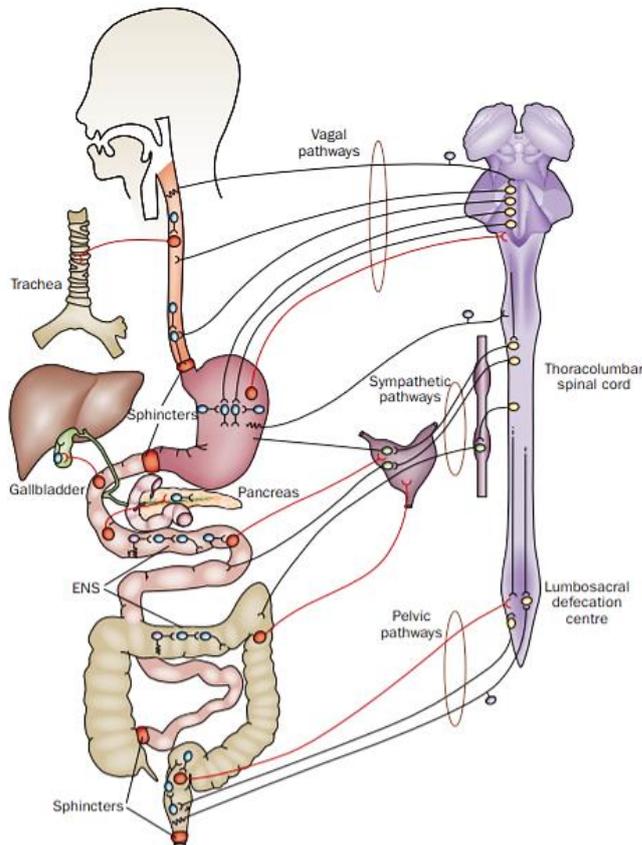


Figure 8 : Innervation du tube digestif. L'innervation du tube digestif comprend de nombreux circuits réflexes localisés dans le SNE (neurones sensitifs en violet, neurones moteurs et interneurones en bleu). La communication entre le SNE et le SNC s'effectue par l'intermédiaire d'afférences et d'efférences du système nerveux sympathique et parasympathique. Les informations sensibles en provenance du tube digestif partent vers le SNC via des neurones extrinsèques primaires afférents. Les informations en provenance du SNC rejoignent le SNE via les voies vagales, sympathiques et les voies sacrées. D'après Furness et al., 2012.

L'innervation parasympathique fait intervenir le nerf vague, pour la partie haute du tube digestif jusqu'au colon transverse, et les fibres nerveuses d'origines sacrées, pour le côlon gauche jusqu'au rectum. Les neurones afférents parasympathiques sont des neurones provenant du nerf vague et dont les fibres nerveuses innervent la paroi digestive, la muqueuse et les muscle lisses. Leurs terminaisons synaptiques perçoivent les distensions mécaniques et sont sensibles aux concentrations luminales de glucose, acides aminés et acides gras à chaînes longues. La stimulation du nerf vague augmente l'activité motrice et sécrétoire du tube digestif. Par ailleurs, la neuromodulation des racines sacrées est utilisée pour soigner les patients atteints d'incontinence fécale. Des études récentes ont également montré que la neurostimulation des nerfs sacrés améliorerait la réparation de l'épithélium et diminuait la réaction inflammatoire locale.

L'innervation sympathique regroupe les fibres nerveuses provenant des ganglions coéliquaux et mésentériques. Les neurones afférents sympathiques sont principalement des neurones nocicepteurs responsables de la détection des douleurs intestinales. Ces fibres efférentes ont pour rôle de diminuer la motricité et la sécrétion.

3.1.3. Les neurones entériques

a) Les différents neurones entériques

Les deux composants majoritaires du SNE sont les cellules gliales et les neurones. Le SNE dénombre environ 500 millions de neurones entériques qui s'étendent du tiers de l'œsophage jusqu'au rectum. Ils sont divers et variés et peuvent être classés selon leur morphologie, leur codage neurochimique et leur fonction (seulement la fonction sera présentée).

Les neurones entériques peuvent être regroupés en trois catégories selon leurs fonctions : les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN), les interneurones et les neurones moteurs.

Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN), sont présents dans les ganglions des plexus sous-muqueux et myentérique, où ils représentent, respectivement, 14% et 30% des neurones totaux. Ils sont sensibles et répondent aux stimuli chimiques provenant de la lumière intestinale, aux déformations mécaniques de la muqueuse et à la contraction musculaire (Clerc and Furness, 2004; Furness et al., 2004). Les IPAN peuvent être activés par de nombreux stimuli, substances et d'autres types cellulaires tels que les cellules endocrines et les cellules immunitaires (Ahlmán and Nilsson, 2001). Ainsi, ce sont des neurones mécano et chimico-sensibles qui vont percevoir les informations provenant des modifications environnementales de l'intestin et transmettre des signaux au circuit réflexe afin de contrôler les fonctions intestinales (sécrétions, motilité et flux sanguin) (Furness et al., 2004).

Les interneurones représentent la population la plus abondante de neurones entériques. Ils sont situés dans le plexus myentérique et leur rôle est de transmettre l'information nerveuse provenant des IPANs aux neurones moteurs. On retrouve deux grandes catégories d'interneurones : les interneurones ascendants et les interneurones descendants (**figure 9**). Les interneurones ascendants, dont les axones projettent dans la direction orale, sont principalement cholinergiques et sérotoninergiques et vont activer les neurones moteurs excitateurs, via la libération d'Ach et de SP (Bornstein et al., 2004). Il existe trois sous-types d'interneurones descendants, dont les axones projettent dans la direction anale, sur les neurones moteurs descendants. En fonction de leur codage neurochimique, les interneurones vont intervenir dans les réflexes sécréto-moteurs (Ach/5-HT) et dans le péristaltisme (Ach/NO/VIP) (Furness, 2000).

Les neurones moteurs sont représentés par 5 différents sous-types : les neurones moteurs musculaires excitateurs, les neurones moteurs musculaires inhibiteurs, les neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs et les non vasodilatateurs ainsi que les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac (Hansen, 2003). Ils reçoivent l'information nerveuse provenant des interneurones et les transmettent aux cellules effectrices afin de réguler les fonctions réflexes. Ainsi, en fonction des stimuli excitateurs et inhibiteurs, les neurones moteurs musculaires excitateurs et inhibiteurs vont, respectivement, sécréter de l'ACh / SP et permettre la contraction des muscles, ou du NO / VIP / ATP, et

entraîner la relaxation des muscles. Les neurones moteurs sécréteurs, vasodilatateurs ou non, vont permettre la sécrétion d'eau et d'électrolytes et la régulation du flux sanguin (Hansen, 2003a).

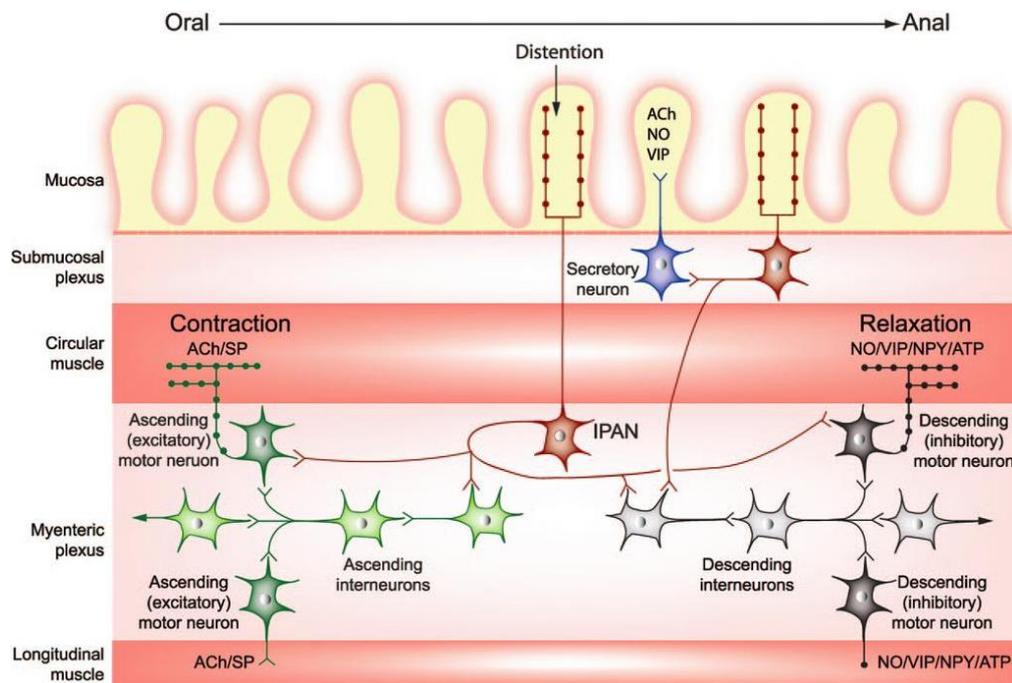


Figure 9 : Représentation schématique des connexions neuronales impliquées dans le réflexe local de péristaltisme. La motricité intestinale est initiée suite à différents stimuli chimiques (glucose, AGCC) dans la lumière intestinale et physiques (distension du muscle), qui vont induire la libération des médiateurs tels que la SP ou l'ATP et activer les IPANs. Ces derniers vont ensuite activer les interneurones ascendants (qui projettent dans le sens oral) qui, en libérant de ACh et SP, vont à leur tour stimuler les neurones moteurs musculaires excitateurs et permettre la contraction musculaire en amont du bol. Simultanément à la stimulation des interneurones ascendants, les IPANs activent également les interneurones descendants (dont les axones projettent dans le sens anal), qui vont stimuler des neurones moteurs inhibiteurs, responsables de la relaxation des muscles en aval du bol alimentaire. D'après Benarroch, 2007

b) Les fonctions des neurones entériques

Les neurones entériques, de par leurs différences de codages chimiques, de morphologies et de localisation, exercent de nombreuses fonctions telles que le contrôle de la motricité intestinale, la sécrétion, la régulation du flux sanguin et de la BEI.

➤ Contrôle de la motricité intestinale

Le transport des aliments de l'œsophage jusqu'au rectum s'effectue grâce au péristaltisme, qui se manifeste, de façon synchronisée, par une contraction des muscles en amont du bol alimentaire et une relaxation des muscles en aval (Huizinga and Lammers, 2009). Répétée de façon séquentielle tout au long du TD, ce réflexe moteur permet l'avancée du bol alimentaire. Cette motricité intestinale est initiée suite

à différents stimuli chimiques (glucose, AGCC) dans la lumière intestinale et physiques (distension du muscle) (Gershon). Les cellules entérochromaffines, localisées dans l'épithélium intestinal, détectent ces stimuli et, en réponse, libèrent des médiateurs tels que la SP ou l'ATP, qui vont activer les IPANs (Furness, 2012). Les IPANs vont activer les interneurons ascendants (qui projettent dans le sens oral) qui, en libérant de ACh et SP, vont à leur tour stimuler les neurones moteurs musculaires excitateurs et permettre la contraction musculaire en amont du bol. Simultanément à la stimulation des interneurons ascendants, les IPANs activent également les interneurons descendants (dont les axones projettent dans le sens anal), qui vont libérer du NO / VIP / NPY et stimuler des neurones moteurs inhibiteurs, responsables de la relaxation des muscles en aval du bol alimentaire (Porter et al., 1997).

Cette motilité intestinale fait également intervenir un troisième acteur : les cellules interstitielles de Cajal. Ces cellules, situées dans le plexus myentérique, possèdent une activité auto-excitatrice « pacemaker ». Elles présentent des contractions spontanées et génèrent des courants électriques lents qui vont se propager et stimuler les muscles lisses par l'intermédiaire de gap junctions, et favoriser le réflexe péristaltique (Ward et al., 2006).

➤ **Contrôle de la sécrétion intestinale**

L'activité sécrétrice de la BEI est une fonction physiologique exercée par les CEI telles que les cellules sécrétrices et les cellules à mucus (Sancho et al., 2003). Ces dernières permettent la production de mucus, d'électrolytes, de fluides et de peptides microbiens (Rescigno, 2011). Suite à des stimuli chimiques ou mécaniques, le circuit réflexe sécrétomoteur fait premièrement intervenir les IPAN, qui vont activer les interneurons, qui à leur tour vont stimuler neurones sécrétomoteurs ascendants et descendants, qui en réponse libèrent l'ACh et le VIP, respectivement (Neunlist et al., 1998). Ces deux neurotransmetteurs vont induire la sécrétion de fluides et d'ions chlore dans la lumière intestinale et limiter l'absorption d'ions sodium (Cooke, 2000). De plus, le VIP peut induire l'expression de TFF3 (Treffo Factor-3), un peptide impliqué dans la stabilisation de la couche de mucus intestinal, et stimuler la production de mucus (Farack et al., 1987; Moro et al., 2001).

➤ **Contrôle de la BEI**

La barrière épithéliale intestinale (BEI), située entre la lumière intestinale et le milieu intérieur, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie digestive (Marchiando et al., 2010). Elle permet, entre autres, le passage des nutriments et électrolytes, et empêche le passage des agents pathogènes et substances toxiques. L'intégrité de la BEI ainsi que son rôle sont assurés en partie par sa conformation structurale et la présence de jonctions serrées telles que les JAM, l'occludine, la claudine, ZO-1 et la cinguline (Suzuki, 2013). Les neurones jouent un rôle important dans la régulation de la BEI, puisque leur stimulation, directe ou via la stimulation du nerf vague / racines sacrées, vont diminuer la perméabilité de la BEI. En effet,

dans des modèles porcins, la neurostimulation des nerfs sacrés diminue la perméabilité de la BEI (Meurette et al., 2012). De plus, dans un modèle de co-culture de cellules épithéliales intestinales et de sous-muqueuse humaine, la stimulation électrique des neurones entraîne une diminution de la perméabilité paracellulaire associée à une augmentation de l'expression de ZO-1, via la libération de VIP (Neunlist et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études *in vitro* qui ont montré que le VIP diminuait la perméabilité de la BEI (Blais et al., 1997; Hällgren et al., 1998). Par ailleurs, la libération de VIP empêcherait l'augmentation de la perméabilité induite par certains pathogènes et bactéries tels que *Citrobacter rodentium* (Conlin et al., 2009). A l'inverse, l'ACh, un des principaux neurotransmetteurs dans le SNE, augmente la perméabilité intestinale (Boudry et al., 2011). De même, un traitement au NPY sur des cultures de cellules épithéliales intestinales (CEI) entraîne une augmentation de l'expression de la claudine-2 et induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Chandrasekharan et al., 2008, 2013). Ainsi, selon les différents types de neurotransmetteurs libérés, les neurones entériques peuvent moduler la perméabilité paracellulaire intestinale.

En plus de leur rôle sur la perméabilité, les neurones régulent également la prolifération des CEI. Dans un modèle de co-culture de plexus sous-muqueux (SM) humain et d'une monocouche de CEI, l'équipe de Toumi et al. a observé une désorganisation de l'épithélium et une augmentation de la prolifération des CEI. Cependant, si les neurones du plexus SM sont électriquement stimulés, il en résulte une diminution de la prolifération des CEI et l'intégrité de l'organisation de la BEI est maintenue (Toumi et al., 2003). Les neuromédiateurs VIP, PACAP, ATP et ADP (Dignass et al., 1998; Lelièvre et al., 1998) diminuent la prolifération des CEI tandis que l'ACh et la 5-HT augmente leur prolifération et la réparation de la BEI (Gross et al., 2012). Parallèlement, chez le rat, l'ablation du plexus myentérique et des fibres nerveuses extrinsèques entraîne une diminution du turn-over des CEI et une augmentation de la taille des neurones VIPergiques dans le plexus SM (See et al., 1990). Ainsi, les neurones entériques modulent et régulent la prolifération des CEI.

3.1.4. Les cellules gliales entériques

a) Localisation et morphologie

Les cellules gliales entériques (CGE) sont les analogues des astrocytes dans le SNC. Dans le SNE, les CGE sont 2 à 7 fois plus nombreuses que les neurones (selon leur localisation) et se distinguent des cellules de Schwann de par leur morphologie (Cook and Burnstock, 1976; Hoff et al., 2008). Les CGE forment un réseau dense qui s'étend sur toute la paroi du TD (**figure 10**) (ruhl, 2005). Elles sont particulièrement localisées dans les ganglions des plexus myentérique et sous-muqueux, le long des fibres nerveuses et au niveau de la muqueuse, où elles entourent les cryptes et se situent à proximité des cellules épithéliales (Van Landeghem et al., 2011; Liu et al., 2013). On distingue 4 types de CGE, qui diffèrent selon

leur morphologie et leur localisation dans la paroi du TD (**figure 10**). Le type I, appelé protoplasmique, correspond aux CGE de forme étoilée possédant de nombreux prolongements courts et irréguliers, et localisées dans les ganglions du plexus sous-muqueux et myentérique. Le type II représente les CGE des muscles circulaires, ayant de multiples extensions parallèles entre-elles et suivant les fibres nerveuses interganglionnaires. Les CGE de type III sont situées dans la muqueuse intestinale et sont caractérisées par de longs prolongements. Enfin, le type IV correspond aux CGE ayant des extensions allongées suivant les fibres musculaires lisses et circulaires.

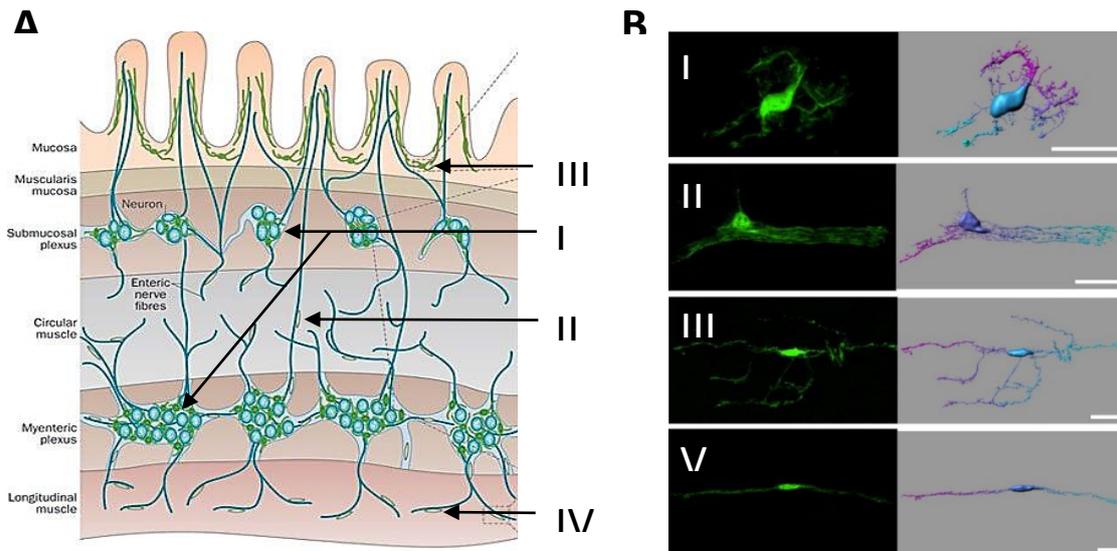


Figure 10 : Représentation des quatre types de cellules gliales entériques selon leur morphologie et localisation. (A) Les CGE sont répertoriées selon 4 sous-types (I à IV) différents selon leur localisation et (B) leur morphologie (SOX 10 en vert, barre d'échelle = 20µm). Adaptation de Gulbransen et Sharkey, 2012 et de Boesmans et al., 2015

b) Les fonctions des cellules gliales entériques

Les CGE ont de nombreuses fonctions au sein du SNE, incluant la régulation fonctionnelle des neurones, un rôle important dans l'immunité et la réponse inflammatoire, la motilité intestinale et la régulation des cellules endothéliales (ces deux derniers points ne seront pas détaillés ici).

➤ Régulation fonctionnelle des neurones

Tout comme les astrocytes, les CGE sont des cellules de soutien des neurones et jouent également un rôle dans le développement, la neurotransmission et la survie neuronale. Le soutien des neurones est en partie assuré par la structure des CGE et leurs filaments intermédiaires, qui englobent les ganglions et les fibres nerveuses.

Dans un modèle murin, l'ablation des CGE induit une dégénérescence des neurones du plexus myentérique (Bush et al., 1998). En effet, les CGE produisent du GDNF et du NT-3, qui sont des facteurs neurotrophiques qui participent au maintien et à la survie des neurones entériques (Bär et al., 1997; Hoehner et al., 1996). De plus, via la sécrétion de médiateurs lipidiques (15dPGJ2), les CGE préviennent la neurotoxicité induite par un stress oxydatif (Abdo et al., 2010). Par ailleurs, une étude plus récente menée au laboratoire a mis en évidence le rôle de la glie lors du développement du SNE. Dans un modèle de culture primaire embryonnaire de neurones entériques de rat, les CGE libèrent des médiateurs gliaux, tels que le GDNF, qui favorisent la pousse axonale, la densité synaptique et la maturation des neurones (**figure 11**) (Le Berre-Scoul et al., 2017).

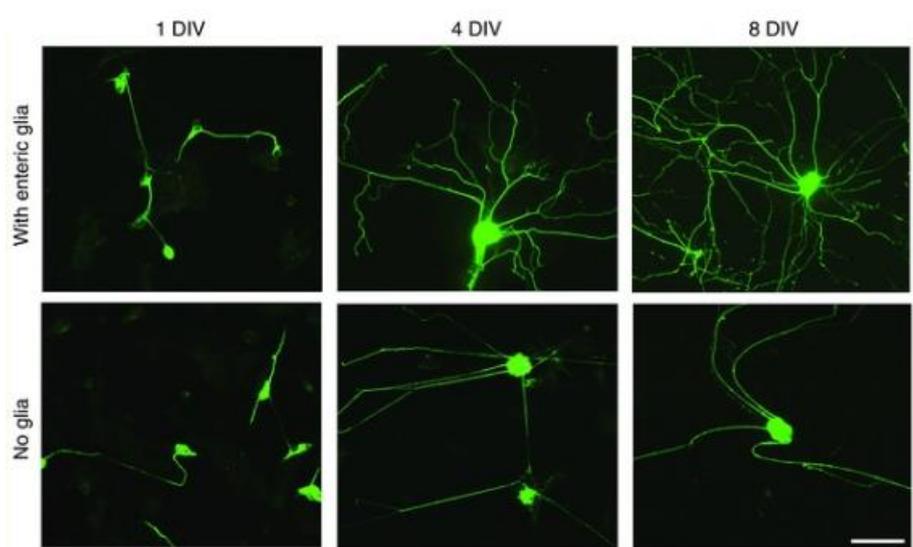


Figure 11 : Les CGE participent à la formation du réseau neuronal. Marquage immunohistochimique des neurones entériques par β -tubuline III, cultivés en présence ou absence de CGE, à 1, 4 et 8 DIV. Echelle = 40 μ m. D'après Le Berre-Scoul et al., 2017

Les CGE jouent également un rôle dans la transmission synaptique en favorisant ou inhibant la synthèse de neurotransmetteurs. L'expression de la glutamine synthase (responsable de la conversion du glutamate et de l'ammonium en glutamine) exclusivement par les CGE suggère un rôle de la glie entérique dans la signalisation glutaminergique (Jessen and Mirsky, 1983; Kato et al., 1990). De plus, les CGE pourraient être une des sources de glutamine servant à la synthèse de glutamate et de GABA par les neurones (Galligan et al., 2000). La L-Arginine, retrouvée uniquement dans les CGE et non dans les neurones, est un précurseur du NO (Nagahama et al., 2001). Dans des modèles *in vivo* de colite au DSS, l'inflammation augmente l'expression d'iNOS dans les CGE et non dans les neurones (Green et al., 2004). Ce qui suggère un rôle des CGE dans la neurotransmission nitrergique. Par ailleurs, les CGE expriment également le transporteur oligopeptide PEPT2, participant à la dégradation des neuropeptides tels que le VIP. La diminution de la dégradation des neuropeptides est toxique pour le neurone et entraîne, en retour,

une diminution de la production des neuropeptides. Enfin, une ablation partielle des CGE entraîne une diminution de l'expression du NO et du VIP dans les neurones entériques, ce qui confirme le rôle des CGE dans la neurotransmission nitrergique et VIPergique.

➤ **Rôle dans l'immunité**

Les CGE jouent un rôle important dans l'inflammation et la réponse immunitaire innée et adaptative. Tout comme les astrocytes, de nombreux stimuli inflammatoires peuvent activer les CGE, qui en réponse vont changer de phénotype pour adopter un profil inflammatoire, entraînant une augmentation de l'expression de la GFAP, des CMH de classe II, d'ICAM-1, et la production de médiateurs inflammatoires (Cirillo et al., 2011; Rühl et al., 2001a). De plus, les CGE expriment des TLR, et plus particulièrement le TLR4, leur permettant d'intervenir dans les mécanismes de la réponse immunitaire innée. Ainsi, dans des modèles *in vitro* de culture de SNE, le traitement au LPS induit une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β , de COX-2 et de PGE2 par les CGE (Murakami et al., 2009). Inversement, les cytokines pro-inflammatoires peuvent également rendre les CGE réactives et les faire sécréter d'autres médiateurs inflammatoires. En effet, dans des modèles *in vitro*, le TNF- α et l'IL-1 β induisent l'activation des cellules gliales entériques (von Boyen, 2004), qui en réponse produisent de l'IL-6 (Rühl et al., 2001b). De la même façon, des traitements à l'IL-6 et l'IL-1 β entraînent une production de métalloprotéase par les CGE (Lin et al., 2007). La réponse des CGE aux LPS et cytokines pro-inflammatoires est maintenant bien caractérisée dans des modèles *in vitro* ; cependant, dans des modèles *in vivo*, la réponse inflammatoire est plus contrastée. En parallèle d'une réponse pro-inflammatoire, les CGE auraient également un rôle immunosuppresseur. En effet, dans des modèles d'inflammation chronique, les CGE inhibent la prolifération des lymphocytes activés (Kermarrec et al., 2016) et, grâce à la production de médiateurs gliaux, sont capables de réguler la production de l'IL-22 (cytokine anti-inflammatoire) par les lymphocytes T (Ibiza et al., 2016).

3.2. L'atteinte du SNE au cours de la MP

3.2.1. Les troubles gastro-intestinaux au cours de la MP

Les troubles GI sont fréquents au cours de la MP et certains peuvent apparaître 10 à 20 ans avant les troubles moteurs (Kalia and Lang, 2015). On retrouve principalement une **constipation**, une **gastroparésie**, des **troubles de défécation**, une **dysphagie** et une **hypersialorrhée**.

La **constipation** est le trouble gastro-intestinal le plus fréquent et touche 30 à 80% des parkinsoniens (Barone et al., 2009; Martinez-Martin et al., 2007; Pfeiffer, 2018). Elle se définit par une fréquence de selles inférieure ou égale à 3 par semaine. Elle est la conséquence d'une diminution du

transit colique (Sakakibara et al., 2003) et peut être accentuée par des **troubles de la défécation**, dû à des anomalies de contractions anorectales (Sakakibara et al., 2011). La sévérité de la constipation est associée à un risque plus élevé de développer une MP. En effet, une première étude menée par Abbott et al. en 2001 a montré que les hommes ayant moins d'une selle par jour avaient 2,7 fois plus de risque de développer une MP comparés aux hommes ayant une selle par jour, et 4,1 fois plus de risque comparés aux hommes ayant plus d'une selle par jour (Abbott et al., 2001). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude menée par Gao et son équipe sur 30.000 américains, montrant que les hommes ayant une fréquence de selle inférieure ou égale à 3 par semaine, avaient 5 fois plus de risque de développer une MP dans les 6 ans, comparés aux hommes ayant une selle quotidienne (Gao et al., 2011).

La **gastroparésie** touche environ 50% des parkinsoniens et se manifeste par un ralentissement de la vidange gastrique, ce qui peut entraîner des nausées, des ballonnements, des vomissements et une sensation de satiété précoce (Pfeiffer, 2003; Poirier et al., 2016). Cette dysfonction de la motricité gastrique pourrait être la conséquence d'une atteinte du noyau dorsal du nerf vague et du SNE (Braak et al., 2006a; Cersosimo and Benarroch, 2012). Outre une détérioration de la qualité de vie des patients, la conséquence la plus problématique de cette gastroparésie est le ralentissement et la diminution de l'absorption de la L-dopa dans le duodénum (Hardoff et al., 2001). Afin de maintenir une absorption optimale de L-dopa, les patients peuvent avoir des traitements complémentaires limitant les reflux et augmentant la vidange gastrique.

La **dysphagie** affecte plus d'un tiers des parkinsoniens et s'observe généralement à un stade avancé de la MP (Edwards et al., 1993; Kalf et al., 2012; Potulska et al., 2003). Elle se traduit par une difficulté à avaler des aliments solides ou semi-liquides, due à un dysfonctionnement de coordination des contractions et relaxations des muscles de la langue, du pharynx et de l'œsophage (Pfeiffer, 2003). La cause exacte de la dysphagie n'est pas connue mais il est toutefois intéressant de noter la présence de CL uniquement dans l'œsophage des patients parkinsoniens atteints de dysphagie, ce qui pourrait contribuer à la dysfonction de la déglutition (Qualman et al., 1984). La dysphagie est associée à une augmentation du risque de la mortalité en causant une malnutrition, déshydratation, fausse route et une pneumonie d'inhalation (Lyons and Pahwa, 2011; Martinez-Ramirez et al., 2015).

L'**hypersialorrhée** se traduit par une production excessive de la salive. En revanche, chez les parkinsoniens, la présence excessive de salive dans la cavité buccale ne serait pas liée à une surproduction de salive mais par une absence de la déglutition. En effet, des études montrent même que les patients parkinsoniens salivent en plus faible quantité (Proulx et al., 2005; Tumilasci et al., 2006) et que la dysphagie ainsi qu'une inclinaison de la tête vers le bas seraient responsables de l'accumulation de salive (Dubow, 2007; Nóbrega et al., 2008). De façon semblable à la dysphagie, l'atteinte du système nerveux autonome et du noyau dorsal du nerf vague seraient impliqués dans les troubles de sécrétion de la salive

et des CL ont été retrouvés dans les glandes salivaires des patients parkinsoniens (Goldman and Postuma, 2014; Del Tredici et al., 2010).

3.2.2. Atteinte de la barrière épithéliale intestinale

Une étude menée au laboratoire s'est intéressée à l'intégrité de la BEI dans le côlon de patients parkinsoniens en analysant l'expression de deux protéines de jonctions, l'occludine et ZO-1. Ils ont observé une forte diminution ainsi qu'une désorganisation de l'occludine, mais pas de ZO-1. De façon surprenante, cette diminution de l'occludine n'était pas associée à des modifications de la perméabilité para ou trans-cellulaire (Clairembault et al., 2015). Cela peut s'expliquer par le fait que l'occludine serait impliquée dans la perméabilité de macromolécules (ayant un poids moléculaire supérieur à 5kDa), et n'affecterait pas le passage de petites molécules comme l'acide sulfonique, utilisée pour mesurer la perméabilité dans cette étude (Al-Sadi et al., 2011). Il semblerait donc que la partie basse du tube digestif des patients parkinsoniens soit altérée d'un point de vue structurel mais n'affecterait pas la perméabilité de petites molécules.

Une autre méthode pour évaluer la perméabilité intestinale consiste à administrer des sucres oraux (mannitol, lactulose, saccharose et sucralose) et d'analyser l'excrétion ultérieure de sucres dans l'urine. Comme ces sucres ne sont pas métabolisés de façon significative dans l'organisme après leur absorption par l'intestin, l'excrétion dans l'urine reflète la perméabilité intestinale (McOmber et al., 2010). Forsyth et al. n'ont pas observé de modification d'absorption du mannitol ni du lactulose mais ils ont montré une augmentation du sucralose dans les urines, suggérant une hyperperméabilité non pas au niveau de l'intestin mais au niveau de la partie basse du TD, et plus particulièrement le côlon (Forsyth et al., 2011). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats et d'évaluer la partie haute du TD des patients parkinsoniens.

3.2.3. Altération du microbiote

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des microorganismes (bactéries, archées, virus, levures et protistes) non pathogènes pour l'homme, qui colonisent le tractus gastrointestinal. Le microbiote intestinal est de loin le microbiote le plus complexe et le plus varié, puisqu'il contient environ 10^{13} bactéries, soit 2 à 10 fois plus de cellules que l'organisme entier n'en contient. Il est composé en grande majorité par deux types de bactéries majeures : les bacteroidetes et les firmicutes (Tropini et al., 2017). Leur répartition augmente tout au long du tube digestif et dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la présence de nutriments et d'oxygène (Donaldson et al., 2016). Le microbiote intestinal joue un rôle dans l'immunité intestinale et l'activité métabolique, en participant à la fermentation des glucides, la synthèse des acides gras à chaînes courtes (AGCC), le métabolisme des lipides et protéines (Hooper et al.,

2001; Jandhyala et al., 2015; Macfarlane and Macfarlane, 2003). D'autres études suggèrent que la flore intestinale serait impliquée dans l'angiogenèse (Stappenbeck et al., 2002) et l'homéostasie intestinale, de par la production de mucus et peptides bactériens (Jandhyala et al., 2015). De nombreuses études supplémentaires ont permis de mettre en évidence une interaction bidirectionnelle entre l'intestin, son microbiote et le cerveau, souvent référée à l'axe microbiote-intestin-cerveau (Cryan and Dinan, 2012). Ce qui laisse penser que les dysbioses intestinales ne se limitent pas aux maladies digestives et pourraient être impliquées dans le développement de maladies psychiatriques et neurodégénératives, telles que l'autisme, Alzheimer ou la MP (Dinan and Cryan, 2017; Jangi et al., 2016).

Des altérations dans la composition du microbiote intestinal chez les patients parkinsoniens ont été retrouvées dans de nombreux cas et différentes populations. Même si certaines variations peuvent être retrouvées, plusieurs études ont observé une augmentation des bactéries *enterobacteriaceae*, *Akkermansia*, *Lactobacillus*, et *Bifidobacterium* ainsi qu'une diminution de *Prevotella*, *Faecalibacterium*, et *Blautia* (Bedarf et al., 2017; Heintz-Buschart et al., 2018; Keshavarzian et al., 2015; Scheperjans et al., 2015; Unger et al., 2016). Cette dysbiose, et plus particulièrement la diminution de *Faecalibacterium* (également diminuée chez les patients atteints de MICI), pourraient être responsables d'une altération de la BEI, de la production d'AGCC et de l'inflammation intestinale.

3.2.4. Corps de Lewy et mort neuronale

Longtemps considérée comme une maladie ne touchant que le SNC, il est désormais bien établi que l'atteinte pathologique est en fait multisystémique et qu'elle affecte également le système nerveux autonome, périphérique et surtout le système nerveux entérique (SNE) (Beach et al., 2010). Durant les 25 dernières années, de nombreuses études ont permis de déterminer la présence et la répartition des CL dans le TD des parkinsoniens.

Jusqu'en 1990, l'analyse des CL dans des pièces chirurgicales et autopsiques s'effectuait par histochimie et le rapport de quatre études a révélé la présence de CL dans le plexus myentérique (PM) et sous-muqueux (PSM) des ganglions de l'œsophage jusqu'au côlon chez des patients MP (Kupsky et al., 1987 ; Qualman et al., 1984; Wakabayashi et al., 1988, 1990). De plus, Wakabayashi et al. ont également montré que la majorité des CL, observés chez les 3 patients étudiés, était retrouvée dans les neurones VIPergiques, et en plus faible quantité dans les neurones dopaminergiques (Wakabayashi et al., 1990). Par la suite, les mêmes travaux ont été réalisés, mais par marquage immunohistochimique. De façon similaire, les CL ont été retrouvés dans les PM et PSM de l'œsophage, estomac et côlon chez la quasi-totalité des patients MP (Beach et al., 2010, 2016; Braak et al., 2006b; Gelpi et al., 2014). La fréquence et la quantité de CL répartis selon les régions du tractus gastrointestinal sont résumées par une étude menée au laboratoire en 2012. L'étude effectuée sur 26 patients a permis d'observer la présence de NL chez 17 patients dans le plexus sous-muqueux du côlon ascendant, chez 11 patients dans le côlon descendant et

seulement chez 6 patients dans le rectum (Pouclet et al., 2012). Ainsi, la présence des CL tout au long du tube digestif serait répartie selon un gradient rostro-caudal (Annerino et al., 2012; Pouclet et al., 2012) (figure 12).

Il est intéressant de noter que les CL sont majoritairement retrouvés dans la partie haute du tube digestif, qui regroupe les organes les plus innervés par le nerf vague, ce qui renforce l'hypothèse d'une propagation de l' α -synucléine du SNE vers le SNC ou réciproquement.

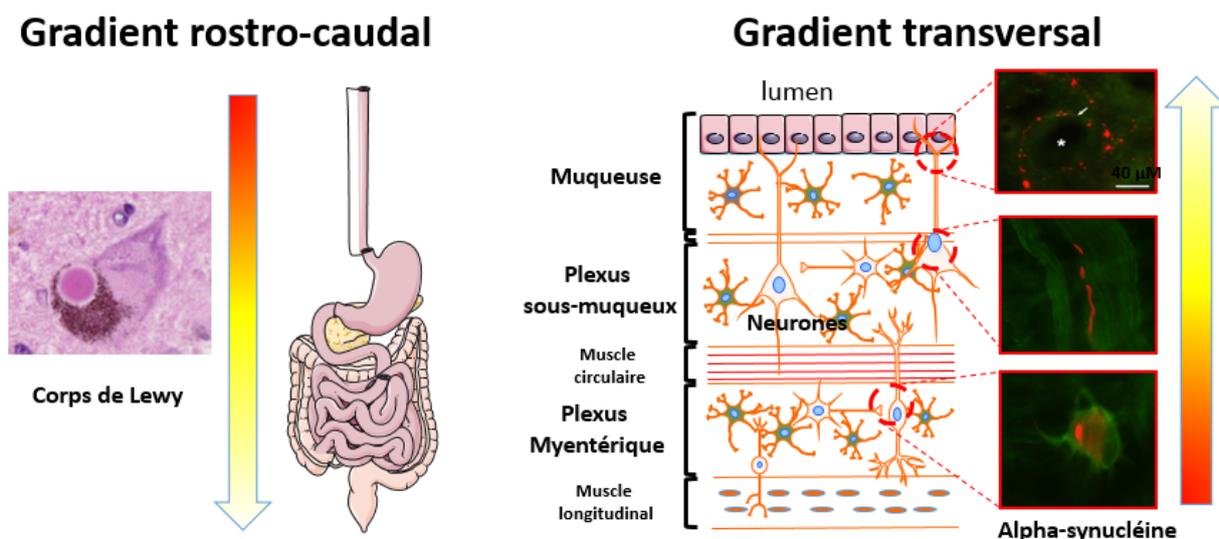


Figure 12 : Représentation schématique de la répartition des CL dans le SNE au cours de la MP. Les CL sont retrouvés selon un gradient rostro-caudal, de l'œsophage jusqu'au rectum, et selon un gradient transversal, majoritairement présents dans PM et en plus faible quantité vers la muqueuse. D'après (Annerino et al., 2012; Pouclet et al., 2012)

Contrairement au SNC, où la neurodégénérescence dans la SNpc durant la MP est sans équivoque, l'atteinte neuronale dans le SNE est plus controversée. Les travaux de Singaram et al. ont montré une diminution des neurones dopaminergiques dans le PSM et le PM de prélèvements coliques de patients parkinsoniens comparés aux témoins (Singaram et al., 1995). L'étude menée par Lebouvier et al. en 2010, a montré qu'il n'y avait pas d'atteinte préférentielle des neurones TH mais une diminution modérée de 15% du nombre total de neurones (Lebouvier et al., 2010). Cependant, cette perte neuronale dans le PM ou PSM n'a pas été retrouvée par la suite (Annerino et al., 2012; Corbillé et al., 2014; Lebouvier et al., 2008; Wakabayashi et al., 1990). Ces données suggèrent que les troubles de la motricité intestinale ne seraient pas liés à une perte de neurones dopaminergiques dans le tube digestif et des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser cette atteinte.

3.2.5. L'hypothèse de Braak

La présence de CL dans le bulbe olfactif et le tube digestif a amené l'anatomiste Heiko Braak à postuler que la MP ne débiterait pas dans le mésencéphale, mais pourrait provenir d'une atteinte du système nerveux périphérique. Selon l'hypothèse de Braak, le SNE serait le premier maillon d'une chaîne d'évènements dégénératifs menant à la SNpc. Un pathogène neurotoxique non identifié pourrait pénétrer dans l'organisme, se transloquer et induire la production d'un stress oxydant favorable à l'agrégation de l' α -synucléine dans les neurones du PSM et du PM. Le noyau dorsal du nerf vague, qui innerve la quasi-totalité du tube digestif, serait atteint par transport rétrograde et cette progression ascendante se terminerai dans la SNpc (Braak et al., 2006c; Desplats et al., 2009).

Cette hypothèse anatomique est appuyée par le mode de propagation de l' α -synucléine, qui peut se propager de neurones à neurones (Soto and Estrada, 2008). Cependant, la théorie de Braak, bien que séduisante, est encore largement débattue (Beach et al., 2009). En effet, elle repose sur une analyse *post-mortem* de la distribution des corps et prolongements de Lewy sur des prélèvements autopsiques. Des études réfutent cette hypothèse en montrant que tous les patients n'ont pas d'atteinte neuronale ni présence de corps de Lewy dans le noyau dorsal du nerf vague (Kalaitzakis et al., 2008).

IV. L'inflammation digestive et la MP

4.1. L'inflammation digestive au cours de MICI

Les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). L'incidence des MICI est la plus élevée dans l'Amérique du Nord et les pays industrialisés, avec une incidence de 5 à 10 pour 100 000 (Hanauer, 2006). Elles touchent généralement les jeunes adultes de 20 à 30 ans, et plus particulièrement les femmes, avec un ratio femmes / hommes de 2 pour 1. Elles se caractérisent par des poussées inflammatoires et des phases de rémission. Les MICI sont considérées comme des maladies d'origines multifactorielles, incluant des facteurs génétiques et environnementaux qui, en interagissant avec la flore intestinale, vont déclencher une activation excessive du système immunitaire avec production massive et incontrôlée de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (Frolkis et al., 2013). Cette activation du système immunitaire entraîne une altération de la BEI et des structures des protéines de jonctions serrées ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale et induit une réponse inflammatoire qui persiste dans le temps (malgré l'absence d'agression) (Schulzke et al., 2009; Welcker et al., 2004; Zeissig et al., 2007).

Même si ces deux maladies sont regroupées sous le terme de MICI et partagent de nombreux symptômes et complications, elles diffèrent d'un point de vue physiopathologique. Au cours de la MC, l'inflammation peut s'étendre sur tout le tractus digestif et les lésions peuvent toucher l'intégralité de la paroi du TD (inflammation de haut grade), tandis que pour la RCH, l'inflammation est localisée dans la

partie basse du tube, le côlon et le rectum, et les lésions sont superficielles, n'affectant que la muqueuse et la sous-muqueuse (inflammation de bas grade) (Fakhoury et al., 2014; Kaser et al., 2010). De plus, leur profil inflammatoire est différent. La MC est associée à une réponse immunitaire de type TH1 tandis que la RCH est associée à un profil de type TH2 (Christophi et al., 2012).

Les traitements de MICI consistent à contrôler la réponse immunitaire, empêcher la destruction de la BEI, et soulager les symptômes, en faisant intervenir des anti-inflammatoires et des immunosuppresseurs. Lorsque l'atteinte est trop importante, les médecins peuvent avoir recours à la chirurgie de résection (Hancock and Mortensen, 2008).

4.2. Données expérimentales chez l'homme

Depuis plus de 20 ans, il est reconnu que l'inflammation du SNC, et plus particulièrement le stress oxydatif et la production de cytokines pro-inflammatoires, contribue à la neurodégénérescence de la SNpc et la progression de la MP (Hirsch et al., 2012). Et, comme les CL ne se limitent pas au SNC mais sont retrouvés tout au long du tractus intestinal, plusieurs équipes se sont demandé si l'inflammation digestive était également présente chez les patients parkinsoniens.

4.2.1. Augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le TD

La toute première étude menée sur l'inflammation digestive chez les patients parkinsoniens a été faite au laboratoire et publiée en 2013. Le niveau d'expression de l'ARNm de plusieurs cytokines pro-inflammatoires a été analysé dans le côlon droit des parkinsoniens par qPCR. Ils ont observé chez 19 patients parkinsoniens une augmentation significative de l'expression du TNF- α , de l'IFN- γ , de l'IL-6 et de l'IL-1 β comparés aux témoins. Ils ont rapporté que l'augmentation de ces cytokines pro-inflammatoires était inversement corrélée à la durée de la MP (Devos et al., 2013). Nous avons confirmé par la suite ces résultats dans le colon descendant des patients parkinsoniens, tout en montrant l'absence d'anomalies chez les patients AMS et PSP (Rolli-Derkinderen et al., 2019). Ce qui montre que l'inflammation digestive n'est pas commune aux synucléinopathies mais semble spécifique de la MP. En revanche, si l'on regarde plus précisément les graphiques représentant l'expression de ces cytokines chez les parkinsoniens, on remarque qu'il y a une hétérogénéité et que deux groupes se distinguent. Certains patients ne montrent aucune variation tandis que d'autres ont jusqu'à 4 fois plus de ces cytokines. L'inflammation intestinale ne toucherait peut-être pas l'ensemble des parkinsoniens, mais seulement un sous-type.

L'augmentation de cytokines pro-inflammatoires était également accompagnée d'une augmentation de la régulation transcriptionnelle de la GFAP et de Sox 10, mais pas de S100B, reflétant une dysrégulation de deux marqueurs gliaux dans le côlon des parkinsoniens. L'augmentation de la GFAP

(transcrit et protéine) dans le côlon des patients parkinsoniens mais non chez les patients AMS ni PSP a été retrouvée dans une étude ultérieure faite au laboratoire (Clairembault et al., 2014). Il est proposé que l'augmentation des marqueurs gliaux reflète une activation des CGE. En effet, dans des modèles *in vitro*, le TNF- α activait les cellules gliales entériques (von Boyen, 2004), qui en réponse produisaient de l'IL-6 (Rühl et al., 2001b). Ainsi, cette inflammation intestinale, médiée par les CGE, pourrait affecter l'homéostasie intestinale (Neunlist et al., 2013) et la structure de l'UNGE au cours de la MP.

4.2.2. Les marqueurs fécaux de la MP

De façon similaire, deux autres équipes se sont intéressées à l'inflammation digestive au cours de la MP et ont analysé les marqueurs fécaux de l'inflammation.

La calprotectine est une glycoprotéine qui représente 60% des protéines totales contenues dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles, et est également présente dans les monocytes et les macrophages (Summerton et al., 2002). Lors d'une mort cellulaire ou une activation des cellules la contenant, la calprotectine est sécrétée et libérée dans la lumière intestinale et peut être dosée dans les selles. Ainsi, la calprotectine fécale (CF) est un biomarqueur qui permet de mettre en évidence avec une grande spécificité la présence de lésions de la muqueuse du TD, et son augmentation chez les patients atteints de MICI est corrélée avec l'infiltration de la muqueuse et les signes cliniques et histopathologiques des patients (Costa et al., 2005; D'Haens et al., 2012). Chez les patients parkinsoniens, on retrouve une concentration 3,5 fois plus élevée de CF comparés aux témoins de même âge, reflétant une lésion de la muqueuse intestinale (Schwiertz et al., 2018). Cependant, comme pour l'étude de Devos et al., il y avait une grande hétérogénéité dans les valeurs analysées, ce qui renforce l'idée que seulement une sous-population des parkinsoniens serait touchée par l'inflammation.

L'équipe de Houser et al a analysé, par dosage immunologique en multiplex, le taux fécal de multiples cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et facteurs de l'angiogénèse dans une cohorte de 156 patients MP. Une augmentation significative de l'IL-1 β et de l'IL-8 (respectivement deux et trois fois plus) a été observée dans les fèces de patients parkinsoniens comparés aux témoins (Houser et al., 2018). De la même façon, des variations d'un facteur 4 de concentrations de ces cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées au sein du groupe MP.

Pour ces deux études, l'augmentation de la CF et de certaines cytokines pro-inflammatoires n'était pas corrélée, ni à l'âge, ni à la durée de la MP, ni à la sévérité des atteintes motrices, ni à la constipation. Ces études ont été faites sur patients parkinsoniens ayant déjà une MP plus ou moins avancée et il serait intéressant de voir si l'on observe une corrélation avec des patients parkinsoniens ayant un stade précoce. En effet, l'étude de Devos et al. montrait que l'expression des cytokines pro-inflammatoires était inversement corrélée avec la durée de la maladie, puis se stabilisait. Il serait donc

intéressant de confirmer ces résultats avec les marqueurs fécaux, ce qui renforcerait l'hypothèse qu'une forte inflammation intestinale pourrait être le départ de la MP, puis diminuerait avec la progression de la MP.

4.2.3. Les infections bactériennes ou virales

Le lipopolysaccharide (LPS) est une endotoxine présente à la membrane externe des bactéries gram-négatif. Les injections de LPS dans la SN de rat entraînent une activation de la microglie, une réponse inflammatoire, une diminution du nombre de neurones TH et des troubles du comportement chez le rat (Sharma and Nehru, 2015). Chez l'homme, le tractus gastro-intestinal peut être exposé à une infection au LPS. Cette inflammation, médiée par le LPS, pourrait débiter dans le SNE et se propager, via le nerf vague, jusqu'au SNC et participer à la progression de la MP.

Une des méthodes pour évaluer l'exposition au LPS consiste à doser la quantité de protéines de liaison au lipopolysaccharide (*LBP : lipopolysaccharide binding protein*) libres circulantes dans le plasma. En cas d'infection au LPS, le LBP va se lier au LPS et sa concentration libre dans le plasma va diminuer. Dans une cohorte de 94 patients MP, le taux de LBP dans le plasma était fortement diminué comparé aux témoins (Pal et al., 2015), suggérant une plus forte exposition au LPS chez les patients MP. En revanche, aucune corrélation entre le taux de LBP et la sévérité des symptômes n'a été retrouvée et, de façon similaire aux précédentes études, un écart-type très important était retrouvé au sein des patients MP, sous-entendant que seule une sous-population de patients PD serait exposée au LPS et à l'inflammation intestinale.

L'étude de Stolzenberg et al. a analysé l'expression de l' α -synucléine dans la partie haute du tube digestif d'enfants présentant une inflammation duodénale et intestinale dues à une exposition bactérienne (*H pylori*) ou virale (Novovirus). Ils ont observé, par marquage immunohistochimique du PSM, une augmentation de l'expression de l' α -synucléine, corrélée à la sévérité de l'inflammation, dans la partie haute du TD chez les enfants ayant une inflammation comparée à celle des témoins (Stolzenberg et al., 2017).

4.2.4. COX-2 et parkinson

Les cyclooxygénases (COX), sont des oxydoréductases qui catalysent la formation des prostanoïdes (les prostaglandines et thromboxanes) à partir de l'acide arachidonique. Chez l'homme, il existe deux isoformes : COX-1 et COX-2. COX-1 est une enzyme qui est exprimée de façon constitutive et qui est impliquée dans la production basale d'eicosanoïdes. COX-1 entraîne la production de prostacycline qui va être sécrétée par l'endothélium, entraînant un effet antithrombogénique (Moncada et al., 1976),

ainsi que par la muqueuse gastrique, dont l'action est de protéger les cellules de l'acidité gastrique et permettre la synthèse de mucus (Whittle et al., 1980). Contrairement à COX-1, l'expression de COX-2 est inductible et induite par des stimuli pro-inflammatoires tels que les cytokines, les endotoxines et les mitogènes (Lee et al., 1992).

Les données sur la neuroinflammation au cours de la MP ont montré que l'expression de COX-2 était augmentée dans les neurones dopaminergiques de la SNpc des patients et dans des modèles murins de la MP exposés au MPTP (Teismann et al., 2003). Par ailleurs, l'inhibition de COX-2 avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens protégeait contre la neurodégénérescence dopaminergique (Hirsch et al., 2012). Comme il a été observé une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le TD des parkinsoniens, une étude récente du laboratoire a analysé l'expression des cyclooxygénases et a observé une augmentation l'expression de COX-2, mais non de COX-1, à la fois au niveau du message et de la protéine dans le côlon de patients MP comparés aux témoins (Pochard et al., 2018). Cette découverte renforce la présence d'inflammation dans le TD des parkinsoniens et sous-entend un possible rôle des prostaglandines (produites par COX-2) dans le processus pathologique de la MP et peut-être sur la régulation de l' α -synucléine dans les neurones entériques.

4.2.5. L'appendice et parkinson

Jusqu'à présent, six études ont recherché une possible association entre l'appendicectomie et la MP, en supposant qu'une appendicectomie diminuerait le risque de développer une MP (Killinger et al., 2018; Marras et al., 2016; Mendes et al., 2015; Palacios et al., 2018; Svensson et al., 2016; Yilmaz et al., 2017). Cette hypothèse était premièrement basée sur le fait que l'appendice vermiforme, innervé par le nerf vague (Altschuler et al., 1993), contient de forte quantité d' α -synucléine (Gray et al., 2014). Une deuxième hypothèse possible est que l'appendicectomie diminuerait le risque de développer une MP en diminuant le risque de développer une MICI (Russel et al., 1997).

Parmi ces six études, deux études observationnelles (Mendes et al., 2015; Yilmaz et al., 2017) et trois études de cohortes (Marras et al., 2016; Palacios et al., 2018; Svensson et al., 2016) n'ont pas observé d'association entre l'appendicectomie et MP (**tableau 2**). En revanche, la dernière étude menée par l'équipe de Labrie et al. a montré que l'appendicectomie diminuait de 20% le risque de développer une MP (Killinger et al., 2018) (table 2). De façon surprenante, ils ont également observé des inclusions d' α -synucléine agrégée dans l'appendice de patients témoins, suggérant que l' α -synucléine agrégée est présente dans l'appendice en conditions physiologiques et qu'elle pourrait être le lieu de départ de la MP.

Pays	Période	Nb de cas	HR app./C
Danemark	1980-2010	265,758	1.14 (1.03-1.27)
Canada	1997-2007	42,999	1.004 (0.74-1.36)
USA	1976-1992	442,700	1.08 (0.94-1.23)
USA	1964-2015	551,647	1.60* (1.46-1.75) vs 1.98 (1.87-2.10) [§]

Tableau 2 : Études de cohorte épidémiologiques existantes sur l'association entre l'appendicectomie et la MP. HR : ratio de danger; les nombres sont compris dans un intervalle de confiance de 95%; * : statistiquement significatif. App. : l'appendicectomie. § : l'incidence de la MP chez 100 000 personnes parmi les sujets atteints d'appendicectomie comparativement à ceux qui n'ont pas d'appendicectomie, respectivement.

4.3. Données épidémiologiques

En 1987, l'équipe de Bihari et Lees suggère pour la première fois une possible association entre la MP et la RCH. Il aura fallu attendre plus de 30 ans pour que quatre études mondiales (Danemark, Suède, taiwan et Etats-Unis) ainsi qu'une méta-analyse étudient l'incidence de la MP parmi les patients atteints de MICI. L'étude rétrospective suédoise a montré que les patients premièrement diagnostiqués pour la MC et la RCH avaient respectivement 60% et 40% plus de risque de développer une MP (table 1) (Weimers et al., 2019). L'étude américaine obtient des résultats similaires et montre que les patients MC et RCH ont 30% plus de risque de développer une MP (Peter et al., 2018). En revanche, l'étude danoise n'observe qu'une augmentation significative du risque chez les patients RCH (Villumsen et al., 2019) et, inversement, l'étude taiwanaise montre que seuls les patients MC ont un risque significativement plus élevé de développer une MP (Lin et al., 2016) (**tableau 3**).

Pays	Période	Nombre de patients MICI	HR Crohn/C	HR RCH/C
Danemark	1977-2014	76,477	1.12 (0.89-1.40)	1.35* (1.20-1.52)
Suède	2002-2014	39,652	1.6* (1.1-2.3)	1.4* (1.2-1.8)
USA	2000-2016	144,018	1.26* (1.03-1.53)	1.31* (1.14-1.51)
Taiwan	2000-2011	8,373	1.4* (1.11-1.77)	0.94 (0.49-1.84)

Tableau 3 : Études de cohorte épidémiologiques sur l'association entre les MICI et la MP. HR : hazard ratio; les valeurs sont comprises dans un intervalle de confiance de 95%; * : statistiquement significatif.

Les données de ces quatre études rétrospectives ont été reprises par une méta-analyse qui montre que les patients atteints de MICI ont 41% plus de risque de développer une MP, et plus précisément 28% et 30% pour les MC et les RCH, respectivement (Zhu et al., 2019). De façon intéressante, dans la cohorte américaine, les auteurs ont observé, parmi les patients MICI, une diminution de 80% du

risque de développer une MP pour les patients ayant reçu un traitement aux anti-TNF comparés aux patients ne recevant pas de traitement ou un autre traitement (Peter et al., 2018). Ce qui suggère que l'inflammation systémique serait impliquée dans la progression de ces trois maladies.

Deux autres études se sont également penchées sur le lien entre la MP et les MICI mais ces dernières ont, cette fois-ci, analysé l'incidence des MICI chez les patients parkinsoniens. De façon surprenante, leurs résultats ne coïncident pas avec les cinq études précédentes. L'étude de Fujioka et al. a observé deux cas de la MC parmi 876 patients parkinsoniens, soit environ 0,2% (Fujioka et al., 2017), ce qui correspond à l'incidence globale de la MC au sein de la population (Loftus et al., 2002). Selon la deuxième étude, les patients ayant une MC ou une RCH auraient respectivement 18% et 12% moins de risque de développer une MP (Camacho-Soto et al., 2018). Ainsi, ces deux études suggèrent qu'il y aurait soit une absence ou une diminution du risque de développer une MP. Cependant, la critique que l'on pourrait faire sur ces deux études est, pour la première, un très faible nombre de patients inclus dans la cohorte (moins de 1000 patients) et une absence de tests cliniques (coloscopie, prise de sang, ...) confirmant un diagnostic négatif pour les MICI.

Ainsi, pour toutes ces études, les données montrent majoritairement un risque plus élevé de développer une MP parmi les patients MICI, mais ces résultats sont observationnels et nécessitent une confirmation de diagnostic clinique.

4.4. Données génétiques

Au cours de ces dernières années, l'association entre les MICI et la MP attire de plus en plus l'attention et des études ont établi des liens génétiques entre la MC et la MP. En effet, ces deux maladies partagent des mutations communes sur deux gènes : le gène LRRK2 et le gène NOD2/CARD15.

➤ LRRK2

Le gène LRRK2 code pour la protéine *leucine-rich repeat kinase 2*, une large protéine à multidomains, qui est impliquée dans de multiple processus cellulaires tels que la pousse neuritique, la morphogénèse des synapses, le trafic vésiculaire, l'autophagie, la synthèse de protéines et aurait un rôle dans la réponse immunitaire innée (Civiero et al., 2018; Cookson, 2012; Dzamko and Halliday, 2012; Lee et al., 2012; Sanna et al., 2012). L'activité de la protéine LRRK2 lui est en partie conférée par ses fonctions enzymatiques, GTPase and sérine-thréonine kinase.

Au cours de la MP, les mutations sur le gène LRRK2 sont les plus fréquentes, représentant environ 4% des formes héréditaires de la MP, et 1% des formes sporadiques (de Rijk et al., 2000). La mutation la plus représentée est la substitution d'un acide aminé en Gly2019Ser (**figure 13**), qui résulte en une augmentation de l'activité kinase de la protéine. Cette mutation a une forte prévalence parmi les juifs

Ashkénazes (30% des formes héréditaires de la MP, 13% des formes sporadiques de la MP) (Ozelius et al., 2006) et parmi les arabes Berbères d’Afrique du Nord (37% des formes héréditaires de la MP, 41% des formes sporadiques de la MP) (Lesage et al., 2006).

Une méta-analyse a mis en évidence 17 gènes associés à des facteurs de risque pour la MC, dont le gène LRRK2 (Umeno et al., 2011). Plus récemment, dans une cohorte de patients atteints de la MC et d’origine juive Ashkénaze, une analyse par séquençage d’exomes a identifié deux variants LRRK2 fonctionnels. La mutation N551K est un facteur de protection contre la MP et la MC, tandis que la mutation N2081D sur le domaine des MAP kinases est un facteur de risque pour ces deux maladies (Hui et al., 2018) (**figure 13**).

Ces données mettent en évidence un lien génétique entre la MP et la MC et suggèrent un rôle central de l’inflammation chronique digestive ainsi que de l’axe intestin-cerveau dans l’initiation et la progression de la MP.

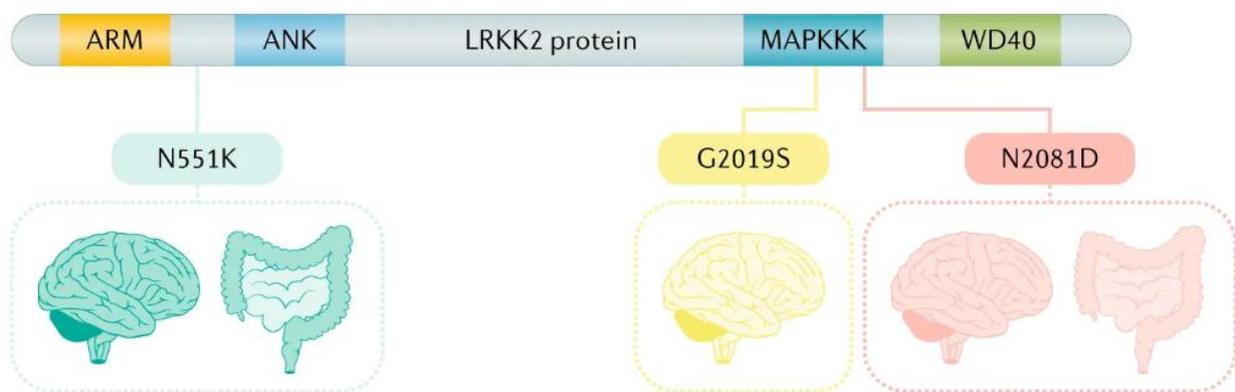


Figure 13 : Les variants de LRRK2 associés aux maladies de Crohn et maladie de Parkinson. Les principales régions de la protéine LRRK2 comprennent un domaine de répétition armadillo (ARM), un domaine de répétition ankyrine (ANK), un domaine de Mitogen-activated protein kinases (MAPKKK) et un domaine de répétition WD40. La mutation de LRRK2 la plus plus retrouvée dans les formes familiales de la MP est la substitution G2019S (jaune). La mutataion N551K réduit le risque de maladie de Crohn et de MP (vert) tandis que N2081D est une variante de risque pour les deux pathologies (rouge). D’après Derkinderen and Neunlist, 2018

➤ **NOD2 / CARD15**

Le gène NOD2 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*), également retrouvé sous le nom de CARD15 (Caspase Recruitment Domain containing protein 15) est situé sur le chromosome 16q12 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001a). Ce gène porte le nom de NOD2 ou CARD-15 car il contient deux domaines CARD (Caspase Recruitment Domain), un domaine NBD (Nucléotide Binding Domaine), un domaine transmembranaire et un domaine LRR (pour Leucine Rich Repeat) (Ogura et al., 2001b). Il code pour une protéine qui, de par ces domaines, reconnaît les peptidoglycanes bactériens et est impliquée dans l’activation de l’apoptose et la voie NFκB (Maeda et al., 2005; Ogura et al., 2001c). Trois mutations sur le gène NOD2 sont associées à la MC : les mutations non-sens R702W (SNP8) et G908R

(SNP12), ainsi que la mutation L1007fs (SNP13), qui, respectivement, augmentent d'un facteur 2, 3 et 4 le risque de développer une MC (Economou et al., 2004). Dans un modèle murin, la mutation sur le gène NOD2 entraînait une augmentation de l'activation de la voie NFκB, une augmentation de la sécrétion d'IL-1β et une inflammation intestinale médiée par les bactéries (Maeda et al., 2005).

En 2007, Bialecka et al. publie pour la première fois une étude associant génétiquement la MC et la MP. En effet, ils ont observé une forte augmentation de la fréquence des trois variants (SNP8, SNP12 et SNP13) associés à la MC, chez 308 patients MP comparés aux 202 témoins (Bialecka et al., 2007). Ce qui confirme un second lien génétique entre la MC et la MP, et renforce l'hypothèse que l'inflammation chronique intestinale pourrait initier la MP.

4.5. Données expérimentales chez l'animal

➤ Les souris traitées aux DSS

Les principaux modèles murins de la MC et de la RCH sont des modèles d'induction de l'inflammation digestive (Neurath, 2012). Un des modèles le plus reconnu est celui de la colite induite par le Dextran Sodium Sulfate (DSS), un agent colitogène avec des propriétés coagulantes. La colite au DSS entraîne une altération de l'épithélium colique, une discontinuité de la BEI, augmente la translocation des bactéries et induit une infiltration massive des cellules immunitaires dans la paroi colique (Okayasu et al., 1990; Xavier and Podolsky, 2007), résultant en une production excessive de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires (Eichele and Kharbanda, 2017; Yan et al., 2009). Les souris DSS ont une augmentation de la perméabilité intestinale, une dysrégulation des jonctions serrées de la BEI (perte de l'expression de ZO-1), une perte de poids, une diminution de la longueur du côlon et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Poritz et al., 2007). En fonction de la durée du traitement, de la concentration et de la fréquence d'administration du DSS dans l'eau de boisson des animaux, ce modèle peut donc reproduire des inflammations coliques aiguës ou chroniques.

Récemment en 2018, Garrido-Gil et al. se sont intéressés à l'interaction entre l'inflammation digestive et l'atteinte dopaminergique dans la SN, dans des modèles animaux de la MP. Pour ce faire, ils ont étudié in vivo, chez le rat et la souris, l'effet d'une déplétion dopaminergique nigrostriatale par injection bilatérale de 6-OHDA sur la neurotransmission colique, ainsi que l'effet d'une inflammation digestive induite par le DSS sur la fonction dopaminergique nigrostriatale. Ils ont observé que la diminution du taux de dopamine dans la SN induisait, dans le SNE, une diminution du niveau d'expression des récepteurs dopaminergique D1 et D2, une augmentation du taux de dopamine et une diminution du taux d'acétylcholine. Inversement, l'inflammation chronique intestinale entraînait également une perte des neurones dopaminergiques accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'IL-1β dans la SN. Leur étude met en évidence une interaction bidirectionnelle entre la perte de neurones dopaminergiques

dans la SN et l'inflammation digestive (Garrido-Gil et al., 2018). Parallèlement, une autre étude a montré que l'injection de 6-OHDA dans la SN entraînait, au bout de 4 ou 8 semaines, une inflammation intestinale accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'IL-1 β et du TNF- α et d'une activation microgliale (Pellegrini et al., 2016).

De plus, dans un modèle *in vivo* de neurodégénérescence dopaminergique basé sur l'injection de LPS dans la SN et d'inflammation colique aiguë induite par l'administration de DSS dans l'eau de boisson, les rats présentaient une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires dans le sérum et la SN, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la BHE. Ces données montrent que l'inflammation périphérique médiée par la colite aiguë potentialiserait l'inflammation induite par le LPS et la neurodégénérescence dans la SN des rats (Villarán et al., 2010).

Ainsi, plusieurs études se sont intéressées à l'effet d'une atteinte dopaminergique dans la SN sur l'inflammation intestinale et l'atteinte neuronale dans le SNE cependant, seule une étude a analysé l'impact de l'inflammation digestive sur la régulation de l' α -synucléine dans les neurones entériques. Dans leur étude, Garrido-Gil et al. ont évalué l'expression de l' α -synucléine par western blot et immunohistochimie dans leur modèle *in vivo* de souris DSS. Les souris, traitées au DSS 0,5% pendant trois semaines, ne présentaient pas de différences significatives de l'expression de l' α -synucléine ni de l' α -synucléine phosphorylée S129 dans les ganglions sous-muqueux et myentériques coliques (Garrido-Gil et al., 2018). Toutefois, l'analyse de l'expression de l' α -synucléine après un traitement inflammatoire aigu n'a pas été effectuée.

➤ **L'inflammation médiée par le LPS**

Dans un modèle murin, l'injection systémique de LPS (5mg/kg) entraînait une activation microgliale, une augmentation de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires ainsi qu'une perte de 23% et 47% du nombre de neurones TH dans la SN, après 7 et 10 mois de traitement, respectivement (Qin et al., 2007). La neuroinflammation dans la SN était accompagnée par une augmentation de l'expression d' α -synucléine et la perte progressive de neurones dopaminergiques induisait des troubles comportementaux et des déficits de la motricité chez les souris (Liu et al., 2008). Parallèlement, une injection systémique de LPS (2,5 mg/kg) induisait une augmentation de l'expression d' α -synucléine ainsi qu'une hyperperméabilité dans le côlon des souris, puis, cinq mois suivant l'injection, une augmentation de la phosphorylation de l' α -synucléine sur son résidu S129 dans un sous-groupe de neurones myentériques (Kelly et al., 2014). Toutefois, cette concentration plus faible de LPS n'entraînait pas d'atteinte neuronale ni de modification d'expression d' α -synucléine dans la SN des souris. Il serait intéressant de reproduire cette étude sur un temps plus long et d'analyser si l'atteinte du SNE persiste au cours du temps et s'il l'on retrouve des modifications de l'expression d' α -synucléine dans la SN et / ou dans le nerf vague afin de

déterminer si l'inflammation systémique peut entraîner une interaction bidirectionnelle ou non entre le SNE et le SNC.

➤ **Le microbiote intestinal**

Des altérations dans la composition du microbiote intestinal chez les patients parkinsoniens ont été retrouvées dans de nombreux cas et différentes populations. Plusieurs études se sont donc demandé si cette dysbiose intestinale apparaissait initialement et contribuait au développement de la MP ou si elle succédait à la neurodégénérescence et était induite par l'inflammation. Pour ce faire, plusieurs travaux ont analysé le rôle d'une augmentation de bactéries intestinales, ayant un profil pro-inflammatoire, sur le cerveau.

La bactérie *Proteus mirabilis*, appartenant à la famille des *enterobacteriaceae*, est retrouvé en plus forte concentration chez les patients parkinsoniens (Choi et al., 2018). Dans un modèle murin, l'administration quotidienne de *Proteus mirabilis* pendant 5 jours (puis euthanasie à J16) entraîne une diminution du nombre de neurones dopaminergiques et une activation de la microglie dans la SN, accompagnés de troubles moteurs, ainsi qu'une augmentation des formes fibrillaires de l' α -synucléine à la fois dans le côlon et la SNpc. De façon intéressante, l'administration de *Proteus mirabilis* induit une forte augmentation de concentration du LPS dans les fèces et le sérum, ainsi qu'une augmentation du TNF- α et des TLR4 dans le côlon des souris, suggérant que la neurodégénérescence dopaminergique et l'agrégation de l' α -synucléine pourraient être médiées par l'action du LPS et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α .

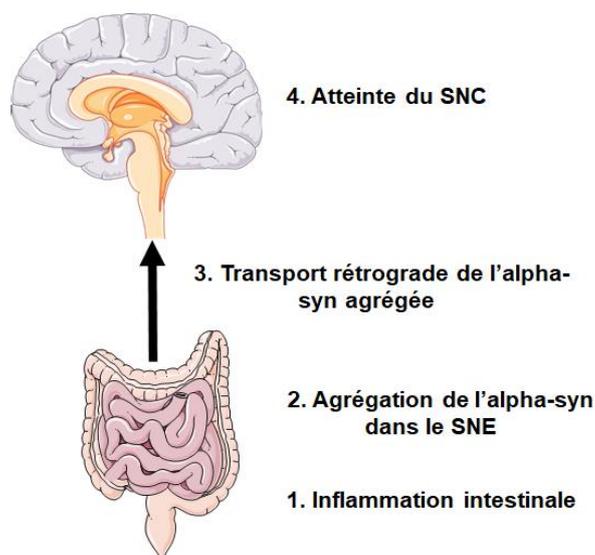
En parallèle, l'équipe de Chen et al. a étudié le rôle de la protéine Curli, une protéine de type amyloïde produite par certaines souches d'*enterobacteriaceae*, sur l'agrégation de l' α -synucléine. L'exposition des rats aux bactéries produisant la protéine Curli entraîne une augmentation des dépôts d' α -synucléine dans le SNC et le SNE et induit une gliose et astrogliose comparés aux rats exposés aux bactéries mutantes ne produisant pas la protéine Curli (Chen et al., 2016).

Ces études montrent donc un rôle du microbiote dans la neurodégénérescence et l'agrégation de l' α -synucléine mais il serait intéressant de voir si une neurodégénérescence dopaminergique dans la SNpc, une inflammation digestive et centrale, peuvent reproduire une dysbiose similaire à celle retrouvée au cours de la MP.

V. Hypothèse et objectifs n°1

De nombreuses données de la littérature mettent en évidence l'atteinte du SNE au cours de la MP. Les troubles gastro-intestinaux se manifestent chez presque tous les patients atteints de la MP et des études de prélèvements autopsiques ont observé la présence d'agrégats d' α -synucléine dans le SNE dans presque tous les cas examinés pathologiquement. Deux études menées sur des rongeurs suggèrent que l'inflammation microbienne intestinale peut favoriser l'augmentation de l'expression et l'agrégation de l' α -synucléine. De plus, une augmentation des niveaux d'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le côlon ainsi qu'une augmentation des marqueurs fécaux ont été observés chez les patients atteints de la MP comparés aux témoins. Le rôle potentiel de l'inflammation gastro-intestinale dans le développement de la MP est encore renforcé par les résultats d'une méta-analyse, montrant que les patients atteints de MICI ont 30% plus de risque de développer une MP.

Ainsi, notre hypothèse de travail était que l'inflammation intestinale aiguë ou chronique pourrait réguler à la hausse l' α -synucléine, entraîner son agrégation, puis son transport rétrograde le long du nerf vague pour atteindre le noyau dorsal du nerf vague puis le mésencéphale.



Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient d'étudier le rôle de l'inflammation intestinale aiguë et chronique sur la régulation et l'agrégation de l' α -synucléine *in vitro* dans un modèle de culture primaire de SNE et *in vivo* dans des modèles murins d'inflammation colique induite au DSS ainsi que dans des biopsies de patients MICI.

VI. Résultats n°1

ARTICLE 1 :

Acute inflammation down-regulates α -synuclein expression in enteric neurons

ORIGINAL
ARTICLE

Acute inflammation down-regulates alpha-synuclein expression in enteric neurons

Alice Prigent*†, Jacques Gonzales*†, Tony Durand*,
Catherine Le Berre-Scoul*, Malvyne Rolli-Derkinderen*, Michel Neunlist*†
and Pascal Derkinderen*†‡ 

*Inserm, U1235, Nantes, France

†University Nantes, Nantes, France

‡Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

Abstract

The protein alpha-synuclein whose expression is strongly implicated in Parkinson's disease (PD) is not only expressed in the CNS but also in the enteric nervous system (ENS). The growing body of evidence suggesting that gastrointestinal inflammation is involved in the development of PD led us to investigate the effects of inflammation on alpha-synuclein expression in primary culture of rat ENS and in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. Using western blot and qPCR, we found that both lipopolysaccharide and a combination of tumor necrosis factor- α and interleukin 1- β decreased the expression levels of alpha-synuclein in primary culture of rat ENS, an effect that was prevented in the presence of the p38 inhibitors SB203580 and BIRB 796. Lipopolysaccharide

and tumor necrosis factor- α /interleukin 1- β had no effect on alpha-synuclein expression in primary culture of rat CNS and in human erythroid leukemia cells. In mice, acute but not chronic dextran sulfate sodium-induced colitis was associated with a decreased expression of colonic alpha-synuclein. As a whole, our findings indicate that acute inflammatory insults down-regulate alpha-synuclein expression in the ENS via a p38 pathway. They provide new insights into the widely discussed concepts of alpha-synuclein expression and aggregation in the ENS in PD and raise issues about the possible role of gastrointestinal inflammation in the development of PD. **Keywords:** alpha-synuclein, colitis, enteric nervous system, LPS, pro-inflammatory cytokines.

J. Neurochem. (2019) **148**, 746–760.

The protein alpha-synuclein is linked both genetically and neuropathologically to Parkinson's disease (PD). Missense mutations of alpha-synuclein are responsible for autosomal dominant forms of PD (Polymeropoulos *et al.* 1997; Krüger *et al.* 1998; Zarranz *et al.* 2004) and Lewy bodies and neurites, the defining neuropathological characteristics of the disease, are primarily composed of aggregated alpha-synuclein (Spillantini *et al.* 1997). In addition, there is now a large body of evidence implicating the expression levels of alpha-synuclein in PD. Both duplications and triplications of the alpha-synuclein gene have been identified in familial forms of the disease (Singleton *et al.* 2003; Chartier-Harlin *et al.* 2004; Ibáñez *et al.* 2004) and analysis of brain from sporadic PD subjects showed higher expression of alpha-synuclein mRNA compared to controls (Gründemann *et al.* 2008). Overall, these findings indicate that the mere over-expression of alpha-synuclein is sufficient to cause genetic PD, and that a subtle alteration of alpha-synuclein expression may be critically involved in the

development of sporadic cases of the disease (Devine *et al.* 2011).

An accumulating body of literature has emerged in the past 25 years to show that PD is not only disorder of the brain but also of the gastrointestinal (GI) tract and more generally speaking of the brain-gut axis (Lebouvier *et al.* 2009;

Received June 30, 2018; revised manuscript received November 22, 2018; accepted December 21, 2018.

Address correspondence and reprint requests to Pascal Derkinderen, Inserm U1235 Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France. E-mails: pascal.derkinderen@chu-nantes.fr; derkinderenp@yahoo.fr.

Abbreviations used: CNS, central nervous system; DLB, dementia with Lewy bodies; DSS, dextran sulfate sodium; ENS, enteric nervous system; ERK, extracellular signal-regulated kinases; GI, gastrointestinal; HEL, human erythroid leukemia; HSP 27, heat-shock protein 27; IL1- β , interleukin 1- β ; LPS, lipopolysaccharide; NSE, neuron-specific enolase; PBS, phosphate buffer saline; PD, Parkinson's disease; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; RPS6, ribosomal protein S6; RRID, research resource identifier; TBS, tris-buffered saline; TLR4, toll-like receptor 4; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

Derkinderen *et al.* 2011). GI symptoms occur in almost every PD patient at some point (Edwards *et al.* 1992) and autopsy studies have consistently shown that alpha-synuclein aggregates are found in the enteric nervous system (ENS) in nearly every case examined pathologically (Wakabayashi *et al.* 1988; Beach *et al.* 2010; Gelpi *et al.* 2014). Why alpha-synuclein accumulates in the enteric neurons is still debated, but numerous findings support a role for local inflammation. Two studies conducted in rodents suggest that gut microbial-induced inflammation may foster alpha-synuclein expression/aggregation, one through production of lipopolysaccharide (LPS) (Choi *et al.* 2018), the other via bacterial amyloid and cross seeding (Chen *et al.* 2016). A recent study reported more alpha-synuclein immunostaining in duodenal biopsies from pediatric patients with upper-GI tract inflammation (Stolzenberg *et al.* 2017). Regarding PD, higher expression levels of colonic pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin 1-beta (IL1- β) (Devos *et al.* 2013) as well as elevated fecal markers of inflammation (Houser *et al.* 2018; Schwartz *et al.* 2018) have been observed in PD patients when compared to controls. The potential role of GI inflammation in the development of PD is further reinforced by the results of two large cohort studies, which showed a significant association between inflammatory bowel disorders and the subsequent occurrence of PD (Peter *et al.* 2018; Villumsen *et al.* 2018).

As a whole, these observations support the assumption that inflammation might regulate enteric alpha-synuclein expression and therefore we set out to examine the regulation of alpha-synuclein expression *in vitro* in rat primary culture of ENS and *in vivo* in a mouse model of colitis.

Material and methods

Cell culture

Primary cultures of rat ENS were generated and cultured as previously described (Coquenlorge *et al.* 2014). Briefly, small intestine of rat embryos E15 (20–28 per isolation from two pregnant Sprague–Dawley rats (Janvier Laboratories SA, Le Genest-St-Isle, France) were removed and finely diced in Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France, Cat# H9259). Tissue fragments were collected in 8 mL of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM-F12) (1 : 1) (Gibco, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France, Cat# 31330-038) and digested at 37°C for 15 min in 0.1% (w/v) trypsin (Sigma, Cat# T1426). The trypsin reaction was stopped by adding 20 mL of medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma, Cat# F2442) and then treated by 0.01% (w/v) DNase I (Sigma, Cat# DN25) for 10 min at 37°C. After trituration with a 10 mL pipette, cells were centrifuged at 750 rpm for 10 min. Cells were counted and then seeded at a density of $2.4 \cdot 10^5$ cells/cm² on 24-well plates previously coated for 2 h with a solution of 0.5% (w/v) gelatin (Sigma, Cat# G6144) in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Life Technologies, Cat# 10010023). After 24 h, the medium was replaced with a

serum-free DMEM-F12 (1 : 1) medium containing 1% (v/v) of N-2 supplement (Life Technologies, Cat# 17502-048). Cells were maintained in culture for 17 days.

For primary culture of CNS cortical neurons, cortex of rat embryos E15 was dissociated mechanically and digested at 37°C for 15 min in 0.1% (w/v) trypsin (Sigma, Cat# T1426). The trypsin reaction was stopped by adding DMEM-F12 (1 : 1) medium (Gibco, Life Technologies Cat# 31330-038) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma, Cat# F2442) and then treated by 0.01% (w/v) DNase I (Sigma, Cat# DN25) for 10 min at 37°C. After trituration with a 10 mL pipette, cells were centrifuged at 750 rpm for 10 min. Cells were counted and then seeded at a density of 150 000 cells per well on 24-well plates previously coated for 2 h with a solution of 0.5% (w/v) gelatin (Sigma, Cat# G6144) in sterile PBS (Gibco, Life Technologies, Cat# 10010023).

Human erythroid leukemia cells (HEL 92.1.7; ATCC Cat# TIB-180, research resource identifier, RRID#CVCL_2481; LGC Standards, Molsheim, France) were cultured in RPMI 1640 (Sigma, Cat# 21875-034) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin, and 50 μ g/mL streptomycin (Life Technologies, Cat#15140-122) at densities from 0.2 to $1.5 \cdot 10^6$ cells/mL. This cell line is not listed as a commonly misidentified cell line by the International Cell Line Authentication Committee and was authenticated in June 2017.

DSS-induced colitis

Two different models of colon inflammation were studied in male C57BL/6NRJ (8 weeks, Janvier) mice. Acute colitis was induced by 4% (w/v) Dextran Sulfate Sodium (36–50 000 kDa; MP Biomedicals, Illkirch, France, Cat# ICN216011080) in the drinking water for 4 days, while chronic colitis was obtained by three cycles of 2% (w/v) DSS in drinking water for 2 days followed by 5 days of water. The corresponding control groups of animals were treated with regular water for the same period. For acute colitis experiments, controls and DSS-treated mice were killed by cervical dislocation on days 1, 2, 3, and 4 ($n = 5$ per group). For chronic colitis experiments, controls and DSS-treated mice were killed on day 18 ($n = 10$ per group). Samples of transverse and distal colon were taken and stored at -80°C in lysis buffer RA1 (Macherey-Nagel, Hoerd, France, Cat# 740961.500) for further analysis by PCR and western blot. No randomization was performed.

All housing and experimental procedures for mice and pregnant rats were carried out in compliance with the local ethical review panel of INSERM (agreement E. 44011; INSERM, Nantes, France) and in accordance with the Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Animals were housed in standard $42 \times 26 \times 15$ cm plastic cages. Bedding consisted of kiln-dried aspen shavings (SAFE, Augy, France). Water and food were available (SAFE) *ad libitum*. Animals were housed at 19–22°C, humidity 55%, and 12 : 12 h light: dark cycle with lights on at 07:30.

Treatment of cells

After 14 days *in vitro*, cells were treated with LPS (Sigma, Cat#L2630), TNF- α (Sigma, Cat#T6674), interleukin 1- β (Sigma, Cat#19401), interleukin-6, interleukin-10, interferon- γ (Preprotech, Neuilly-sur-Seine, France, Cat#200-06, 200-10, and 300-02

respectively), SB 203580 (Merck, Calbiochem, Fontenay sous bois, France, Cat#559395), BIRB 796 (Tocris, Lille, France, Cat#5989), and 6o (Tocris, Cat# 3222) for the indicated period of time.

Western blot

Cells were harvested and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France, Cat# 20-188) containing 2 mM orthovanadate (Sigma, Cat# S6505), phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma, Cat# P5726), and a protease inhibitors cocktail (Sigma, Cat# 11697498001). Colonic samples stored in RA1 buffer were lysed with the 'Precellys 24' tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France, Cat# P000669-PR240-A) and total proteins were precipitated using protein precipitator and re-suspension buffer (protein solving buffer and tris(2-carboxyethyl)phosphine-reducing agent) from NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France, Cat# 740966) according to the manufacturer's instructions. Samples were further prepared for electrophoresis by diluting with NuPAGE sample buffer (Life Technologies, Saint-Aubin, France, Cat# NP0008) then heated at 98°C for 5 min. Lysates were separated using the NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Life Technologies, Cat#NP0336BOX) together with the 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate running buffer (Life Technologies, Cat# IB23002) before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes (Life Technologies, Cat# NP0002) with the iBlot™ Dry Blotting System (Life Technologies, Cat# IB21001). Nitrocellulose membranes were treated with 4% (v/v) paraformaldehyde and 0.01% (v/v) glutaraldehyde (Cat#G6257, Sigma) in order to enhance membrane retention of alpha-synuclein (Sasaki *et al.* 2015). Membranes were then blocked for 1 h at 21°C in Tris-buffered saline (Sigma, Cat# T5912) with 0.1% (v/v) Tween-20 (Sigma, Cat# P1379) and 5% (w/v) non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-alpha-synuclein (C-20)-R (1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany, Cat# sc-7011-R, RRID: AB_2192953), mouse monoclonal anti-alpha-synuclein Syn-1 (1 : 1000; BD Bioscience, Le Pont-de-Claix, France, Cat# 610787, RRID:AB_398108), mouse monoclonal anti-PGP 9.5 (1 : 2000; Thermo Fischer Scientific, Saint Herblain, France, Cat# MA1-83428, RRID:AB_935198), mouse monoclonal anti-β-actin (1 : 10000; Sigma, Cat#A5441, RRID:AB_476744) rabbit polyclonal anti-phospho-p38, -phospho-JNK, -p38, and -JNK (1 : 1000; Cell signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France Cat#9211, 9251, 9212, and 9252; RRID:AB_331641, AB_331659, AB_330713, AB_2250373, respectively), and mouse monoclonal anti-toll-like receptor 4 (TLR4) (Novus, Bio-Technologie, Lille, France, Cat# NB100-56566, RRID:AB_2205129). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Life Technologies Cat# 31460, diluted 1 : 5000) or anti-mouse antibodies (Sigma, Cat# A9044, diluted 1 : 5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (Biorad, Clarity ECL, Marnes-la-Coquette, France, Cat# 170-5061). For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J software (Bethesda, MD, USA) (version 1.51). To allow comparison between different films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls. The value of alpha-synuclein immunoreactivity was normalized to the amount of PGP 9.5, while phospho-p38 and -JNK immunoreactivity were normalized to p38 and JNK immunoreactivity, respectively.

Quantitative PCR analysis

RNA extraction from enteric primary culture was performed with RNeasy Minikit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France, Cat# 74104) according to the manufacturer's instructions. The following primers were used:

- Alpha-synuclein # NM_019169.2, forward: 5'-GGCAAG GGTGAAGAAGGGTA-3'; reverse: 5'-GTCTTGGTAG CCTTCTGAA-3'
- Ribosomal protein S6 # NM_017160.1, forward: 5'-GCA TTGTGGATGCCAACCTG-3'; reverse: 5'-GTCTGGG CTTCTTACCTTCTT-3'

For colonic tissues stored in RA1 buffer, RNA extraction was performed with NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France, Cat# 740966) according to the manufacturer's instructions. One µg purified mRNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France, Cat # 18080044). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France, Cat# AB4166B) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies, Cat# 4376600). The following primers were used:

- TNFα # NM_013693.3, forward: 5'-GAACTTCGGGGT GATCGGTCC-3'; reverse: 5'-GCCACTCCAGCTGCTC CTCC-3'
- IL-1β # NM_008361.4, forward: 5'-GCCTCGTGCTG TCGGACCCATA-3'; reverse: 5'-TTGAGGCCCAAGG CCACAGGT-3'
- Ribosomal protein S6 # NM_001010.2, Forward: 5'-CCA AGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'; Reverse: 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3'

Immunohistochemistry

Primary culture of rat ENS was fixed in PBS with 4% (v/v) paraformaldehyde at 21°C for 30 min. Following pre-incubation in PBS containing 5% (v/v) donkey serum and 0.5% (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, Cat # X100) for 30 min, cells were incubated with the following primary antibodies overnight at 4°C: mouse monoclonal anti-alpha-synuclein Syn-1 (1 : 1000; BD Bioscience, Cat# 610787), rabbit monoclonal anti-rat alpha-synuclein D37A6 (1 : 500; Cell Signaling Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France, Cat#4179, RRID:AB_1904156), mouse monoclonal anti-HuC/D (1 : 200; Life Technologies, Cat#A21-271, RRID:AB_221448), mouse monoclonal anti-β-tubulin III (1 : 1000; Sigma, Cat# T8328, RRID:AB_1844090), rabbit polyclonal anti-S100β (1 : 1000; Agilent, Dako Omnis, Courtaboeuf Les Ulis, France, Cat# GA50461-2), mouse monoclonal anti-TLR4 (1 : 1000, Novus, Cat# NB100-56566, RRID:AB_2205129), and goat polyclonal anti-α-smooth muscle actin (1 : 500; Abcam, Paris, France, Cat# ab21027). After secondary antibodies, images were acquired with an Olympus IX 50 fluorescence microscope.

Cell viability and neuronal damage assays

Evaluation of neuronal damage was performed using neuron-specific enolase (NSE) release into the culture medium and counting of Hu-immunoreactive neurons. NSE released in the culture supernatant was quantified using a rat NSE ELISA kit

(MyBioSource, Catalog #MBS2508955; CliniSciences, Nanterre, France) according to the manufacturer's protocol. Results were expressed in nanograms per mL. The total number of HuC/HuD-immunoreactive neurons was counted in the entire culture well treated by LPS and TI and expressed as percentage of the number of total neurons in control wells (see immunohistochemistry).

Cell viability was assessed using the Celltiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France, Cat#G3582). Primary culture of rat ENS was cultured in 12-well plates and treated as described above. After removal of the medium, CellTiter 96 Aqueous One Solution reagent was added to each well, according to the manufacturer's instructions. Neuronal viability was determined by measuring absorbance at 490 nm.

Filter trap assay

Ten micrograms of cell lysates was subjected to vacuum filtration through a 96-well dot blot apparatus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France, Cat#1706545) with 0.45 µm pore size cellulose acetate membranes (Sterlitech, Kent, OH, USA, Cat#CA0453001). Samples of frozen temporal cortex from one *post mortem* human brain with dementia with Lewy bodies were obtained from the Neuropathology Department of Angers (Dr Franck Letourmel) and were processed in the same way to serve as a control. The resultant membranes were processed as indicated in the western blot section using rabbit monoclonal anti-human alpha-synuclein MJFR1 (1 : 1000; Abcam, Cat# ab138501, RRID:AB_2537217) for dementia with Lewy bodies samples or rabbit monoclonal anti-rat alpha-synuclein D37A6 (1 : 500; Cell-Signaling, Cat#4179, RRID:AB_1904156) antibodies for cell lysates.

Statistics

GraphPad Prism software version 7.05 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis. Because data were not normally distributed according to the Kolmogorov–Smirnov test, we used non-parametric tests. The differences between groups were calculated by a Mann–Whitney *U*-test. The effects of SB203580 on LPS- and TI-induced down-regulation of alpha-synuclein in western blots were analyzed with a Kruskal–Wallis non-parametric ANOVA test, followed by Dunn's *post hoc* test. No sample size calculation and no blinded analysis were performed. No test for outliers was conducted on the data.

Results

Alpha-synuclein is expressed by neurons in primary culture of rat ENS

After 17 days of culture, enteric neurons (Hu immunostaining, Fig. 1a) were organized in ganglia connected to each other by interganglionic fiber strands as demonstrated by β-tubulin III immunostaining (Fig. 1b). Enteric glial cells, identified by S100-β immunostaining, were also present in enteric ganglia and along interganglionic fiber strands (Fig. 1a and c). This neuronal network laid on a smooth muscle cells monolayer (Fig. 1a). Immunolabelling with two different anti-alpha-synuclein antibodies revealed that alpha-synuclein was present

in the cytoplasm of the soma of enteric neurons (Fig. 1b and Figure S1). A subset of enteric neurons expressed alpha-synuclein in both the nucleus and the cytoplasm of the soma (Fig. 1b and Figure S1). By contrast, alpha-synuclein was not expressed by enteric glial cells (Fig. 1c).

LPS and TNF-α/IL1-β decrease the expression levels of alpha-synuclein in primary culture of ENS

Primary culture of rat ENS expresses the LPS receptor TLR4 (Coquenlorge *et al.* 2014) (Figure S2a and b) as well as the receptors for TNF-α and IL1-β (Gougeon *et al.* 2013). To determine whether inflammation alters alpha-synuclein expression, we treated primary culture of rat ENS with 0.1 µg/mL LPS and a combination of two pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL1-β (TNF-α/IL1-β, 10 nM each, hereafter referred to as TI) for 72 h. Such concentrations of LPS, TNF-α, and IL1-β were not neurotoxic in previous reports that used cultured ENS (Gougeon *et al.* 2013; Coquenlorge *et al.* 2014; Voss and Ekblad 2014). Cell lysates were analyzed by western blot with two anti-alpha-synuclein antibodies [(C20)-R and Syn-1] that recognize different epitopes (Perrin *et al.* 2003; Preterre *et al.* 2015). Both TI and LPS caused a significant decrease in the amount of alpha-synuclein in primary culture of ENS (Fig. 2a and b). We verified that both treatments did not affect cell viability, as determined by measurement of NSE release into the culture medium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium assay, and counting of Hu-immunoreactive cells (Fig. 2c). The decrease in alpha-synuclein protein in response to LPS and TI was accompanied by a significant down-regulation at the mRNA level (Fig. 2d). Treatment with either LPS or TI did not induce alpha-synuclein aggregation (Fig. 2e) and did not change the subcellular localization of alpha-synuclein (Fig. 1b and Figure S1). By contrast to TNF-α and IL1-β, other pro-inflammatory cytokines including interleukins-6 and -10 and interferon-γ had no significant effects on alpha-synuclein expression (Fig. 2f).

The effects of LPS and TI on alpha-synuclein expression are mediated through a p38 signaling pathway

Both JNK and p38 signaling pathways are strongly activated by inflammatory mediators in numerous cell types (Hotamisligil and Davis 2016). To determine the respective role of these two signaling pathways on alpha-synuclein expression, we used antibodies specific for the dually phosphorylated active forms of p38 and JNK together with specific inhibitors of these two kinases. TI caused a rapid and transient activation of p38 in primary culture of ENS (Fig. 3a), while LPS induced a more delayed and more sustained activation of the kinase (Fig. 3b). To further investigate the role of p38 signaling pathway in alpha-synuclein expression, we used two different structurally unrelated p38 inhibitors SB 203580

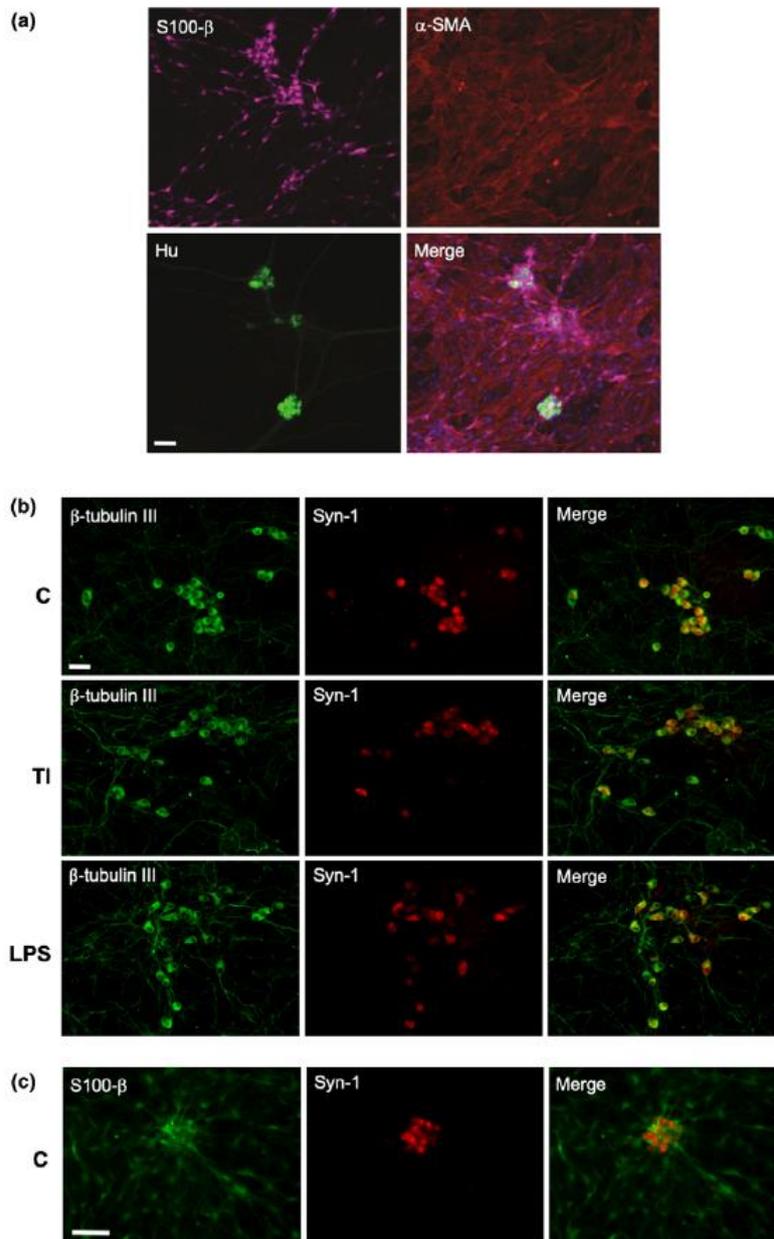


Fig. 1 Distribution and localization of alpha-synuclein in primary culture of rat enteric nervous system (ENS) under basal condition and after treatment with lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor- α and interleukin 1- β (TNF- α /IL1- β). (a) Primary culture of rat ENS at 14 days *in vitro* was immunolabeled with anti-Hu, anti-S100- β , and anti- α -smooth muscle actin antibodies. Scale bar is 50 μ m. (b) After 14 days in culture, primary culture of rat ENS was treated with 0.1 μ g/mL LPS, 10 nM TNF- α /IL1- β (TI), or vehicle (C, control) for 72 h, then immunostained with Syn-1 and anti- β -tubulin III antibodies. Scale bar is 25 μ m. (c) Primary culture of rat ENS at 14 days *in vitro* was immunolabeled with Syn-1 and anti-S100- β antibodies. Scale bar is 50 μ m.

(Cuenda *et al.* 1995) and BIRB 796 (Pargellis *et al.* 2002). We first evaluated the efficacy of these two compounds in primary culture of ENS by showing that they efficiently decreased the phosphorylation of the p38 downstream target heat-shock protein 27 (Figure S4). Treatment with SB 203580 (10 μ M) or BIRB 796 (1 μ M) for 72 h induced a significant increase in the expression levels of alpha-synuclein (Fig. 3c and d). Treatment with SB 203580 fully reversed the TI- and LPS-induced down-regulation of alpha-synuclein (Fig. 3e). TI and LPS had only a marginal effect on JNK phosphorylation (Figure S3a and b) and no

change in alpha-synuclein expression levels was observed following JNK inhibition by 6o (Figure S3c).

LPS and TI have no effects on alpha-synuclein expression in primary CNS neurons and HEL cells

In order to determine whether the effects of LPS and TI on alpha-synuclein expression are specific to enteric neurons, we used primary culture of rat CNS neurons and human erythroleukemia (HEL) cell line, which both constitutively express alpha-synuclein (Dettmer *et al.* 2013; Corbillé *et al.* 2016). No changes in the expression levels of alpha-

synuclein were observed after a 72 h-treatment with either LPS or TI in these two cell types (Fig. 4a and b). In addition, and by contrast to primary culture of rat ENS, treatment of

primary CNS neurons and HEL cells with SB 203580 had no effect on alpha-synuclein expression (Fig. 4c and d and Figure S4).

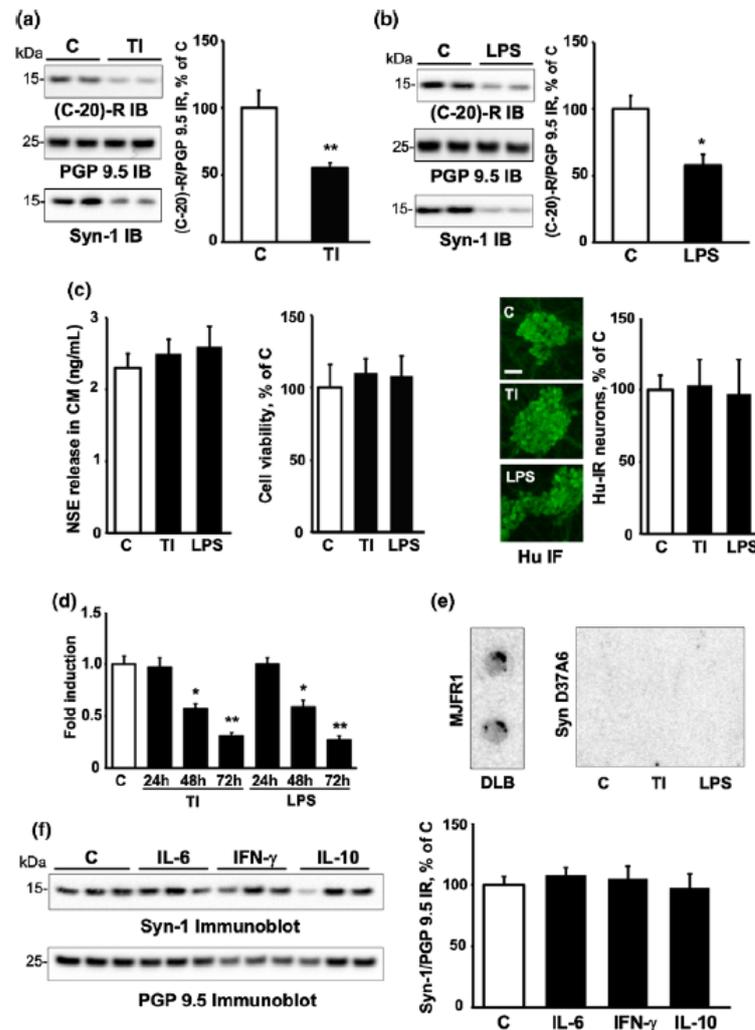


Fig. 2 Effects of lipopolysaccharide (LPS) and pro-inflammatory cytokines on the expression of alpha-synuclein in primary culture of rat enteric nervous system (ENS). (a and b) After 14 days in culture, primary culture of rat ENS was treated with vehicle (phosphate buffer saline, control), 0.1 μg/mL LPS, or 10 nM TI for 72 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using two different antibodies specific for alpha-synuclein (C20-R and Syn-1). Membranes were probed with anti-PGP9.5 antibodies to ensure equal loading of neuronal proteins. Values represent mean ± SEM ($n = 8$ and 14 per condition for LPS and TI, respectively; treated vs. control $*p < 0.05$; $**p < 0.01$). (c) Cell survival and viability were evaluated by measuring the release of neuron-specific enolase in the culture medium (left, in ng/mL), performing an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium assay (middle, expressed as percentage of controls) and by Hu neuronal counting (right, expressed as percentage of controls). Three representative Hu

staining are shown, scale bar 25 μm). Values represent mean ± SEM ($n = 4, 12,$ and 6, respectively). (d) Quantitative PCR analysis of alpha-synuclein mRNA in primary culture of rat ENS treated after 14 days *in vitro* with vehicle (control), LPS, or TI for 24, 48, or 72 h. Values represent mean ± SEM ($n = 10-20$ samples per condition; treated vs. control $*p < 0.05$; $**p < 0.01$). (e) Lysates from primary culture of ENS treated with LPS, TI, and vehicle (control) for 72 h were subjected to filter trap assay analysis with cellulose acetate membrane using anti-rat alpha-synuclein D37A6 antibody. Samples from dementia with Lewy bodies brain served as control and were analyzed with anti-human alpha-synuclein MJFR1 antibody. Data shown are representative of four independent experiments. (f) After 14 days in culture, primary culture of rat ENS was treated with vehicle (control), 10 nM interleukin-6 (IL-6), IL-10, and interferon-γ (IFN-γ) for 72 h. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis and quantification was performed as described in (a) ($n = 4$). IB is for immunoblot.

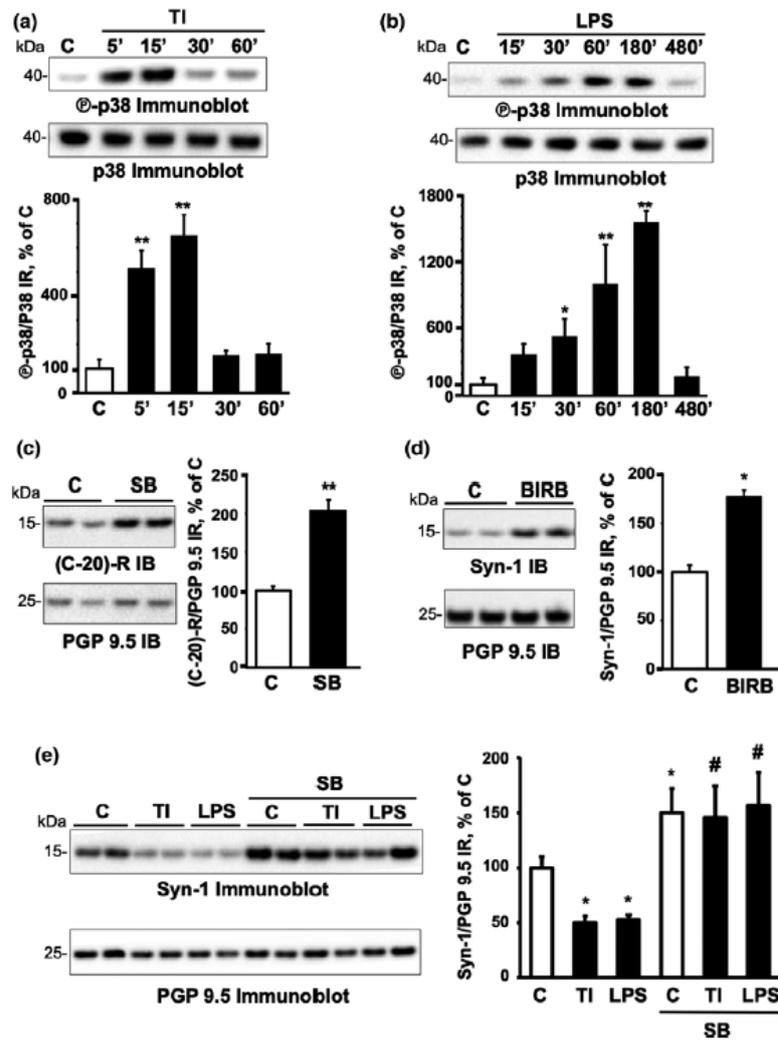


Fig. 3 Roles of the p38 signaling pathway on lipopolysaccharide (LPS)- and tumor necrosis factor- α /interleukin 1- β -induced down-regulation of alpha-synuclein. (a and b) After 14 days in culture, primary culture of rat enteric nervous system (ENS) was treated with vehicle (control), with TI for 5, 15, 30, and 60 min or with LPS for 15, 30, 60, 180, and 480 min. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for the dually phosphorylated (active) forms of p38 (@-p38). After stripping the membranes were re probed with total p38 antibody. The values of active phospho-p38 were normalized to the amount of total p38. Values represent mean \pm SEM ($n = 4-8$ samples per condition; treated vs. control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). (c) Primary culture of rat ENS was treated with vehicle (control) or 10 μ M of the p38 inhibitor SB203580 for 72 h and

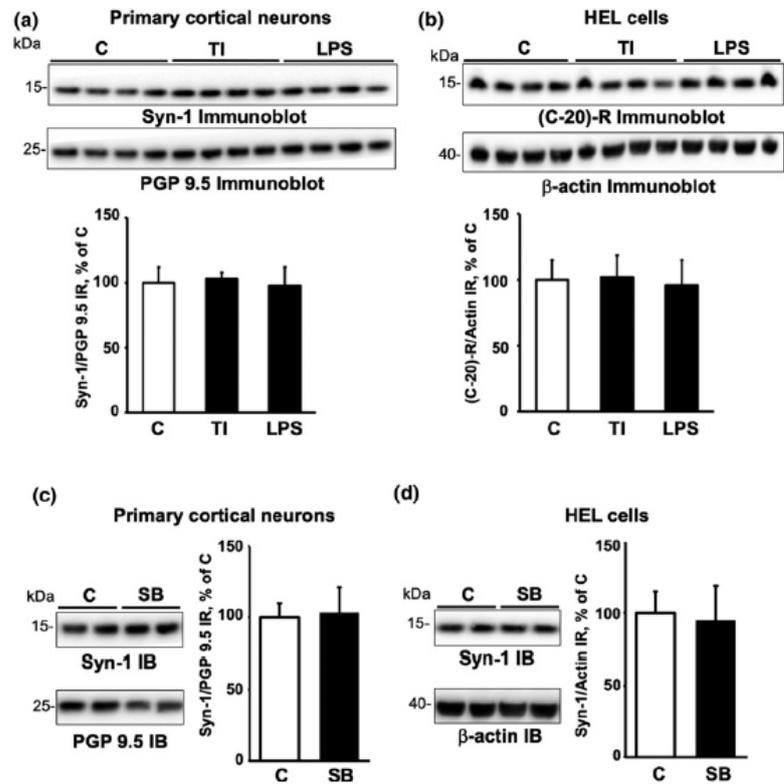
cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-alpha-synuclein antibody (C-20)-R. Values represent mean \pm SEM ($n = 15$; treated vs. control ** $p < 0.01$). (d) Primary culture of rat ENS was treated with vehicle (control) or 1 μ M of the p38 inhibitor BIRB 796 for 72 h and cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-alpha-synuclein antibody Syn-1. Values represent mean \pm SEM ($n = 8$; treated vs. control * $p < 0.05$). (e) Primary culture of ENS was treated with either LPS or TI for 72 h in the absence (-) or presence (+) of 10 μ M SB203580 and cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-alpha-synuclein antibody Syn-1. Values represent mean \pm SEM ($n = 8-14$; treated vs. control * $p < 0.05$; treated in the presence of SB203580 vs. in its absence: # $p < 0.05$). IB is for immunoblot.

Acute but not chronic DSS-induced colitis is associated with a decreased expression of alpha-synuclein

To determine whether inflammation impacts alpha-synuclein expression *in vivo*, we used two models (acute and chronic) of DSS-induced colitis in mice. The colonic pro-

inflammatory cytokines expression profile for each model is shown in Figure S5. In the acute/severe model of colitis, which was induced by a 4-day 4% DSS regimen, we observed a significant decrease in the expression levels of alpha-synuclein in the distal colon at day 1 and day 3

Fig. 4 Effects of lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- α /interleukin 1- β , and SB203580 on the expression of alpha-synuclein in primary culture of rat CNS neurons and human erythroid leukemia (HEL) cells. (a) Primary cultures of rat cortical neurons were treated with vehicle (control), 0.1 μ g/mL LPS, or 10 nM TI for 72 h and cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-alpha-synuclein antibody Syn-1. Values represent mean \pm SEM ($n = 15$). (b) HEL cells were treated with vehicle (control), 0.1 μ g/mL LPS, or 10 nM TI for 72 h and cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-alpha-synuclein antibody (C-20)-R. (c and d) Primary cultures of rat cortical neurons and HEL cells were treated with vehicle (control) or 10 μ M SB203580 for 72 h and cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-alpha-synuclein antibody Syn-1. Values represent mean \pm SEM ($n = 10$ and 6, respectively). IB is for immunoblot.



(Fig. 5a) when compared to control animals (a trend approaching but not reaching significance was observed at days 2 and 4, data not shown). By contrast, when a more chronic model of colitis (three cycles of 2% DSS for 2 days followed by 5 days of water) was used, no changes in the expression levels of alpha-synuclein were observed between treated and control animals.

Discussion

Despite the growing evidence linking inflammation to PD development, very few studies have directly examined the effects of inflammatory mediators on alpha-synuclein expression in cell lines (Tanji *et al.* 2001) and our study is the first performed in enteric neurons. We show that both LPS and TI down-regulate alpha-synuclein expression at both mRNA and protein levels in primary culture of rat ENS, but not in primary culture of rat cortical neurons and in HEL cells. It is unlikely that the lack of effects in CNS neurons and erythroid cells is due to an absence of receptors, as current and previous observations have shown that both cell types express functional TLR4, TNF, and interleukins receptors (Inoue *et al.* 2006; Wang *et al.* 2013). One possible explanation may be that the enteric glia and smooth muscle cells, which are present in cultured ENS may contribute to the LPS- and TI-induced phenotypes in non-cell autonomous

ways. Another explanation might come from intrinsic differences between the neuron subtypes. In an elegant article, Rideout *et al.* compared the regulation of alpha-synuclein levels between different subtypes of rat primary CNS neurons and showed that basic fibroblast growth factor promoted alpha-synuclein expression within dopaminergic, but not GABAergic or cortical neurons (Rideout *et al.* 2003). An increase in intracellular cAMP, either induced by non-hydrolyzable analogs or by β 2 adrenoreceptor activation, down-regulated alpha-synuclein in PC12 and human neuroblastoma cell line (Stefanis *et al.* 2001; Mittal *et al.* 2017), while an opposite effect was observed in primary ENS culture (Paillusson *et al.* 2010). Such a specific regulation of alpha-synuclein might be relevant in the context of PD as the disruption of transcriptional regulation in different neuronal populations could underlie the clinical and neuropathological heterogeneity observed in this neurodegenerative disorder (Leclair-Visonneau *et al.* 2018).

So far, most existing studies on alpha-synuclein expression in neurons have identified the extracellular signal-regulated kinases (ERK) pathway as being a key player. The induction of alpha-synuclein by growth factors in PC12 cells is ERK dependent (Clough and Stefanis 2007) as is the regulation of alpha-synuclein expression by neuronal activity in cultured ENS (Paillusson *et al.* 2010). We show in this study that the p38 signaling pathway is also critically involved in the

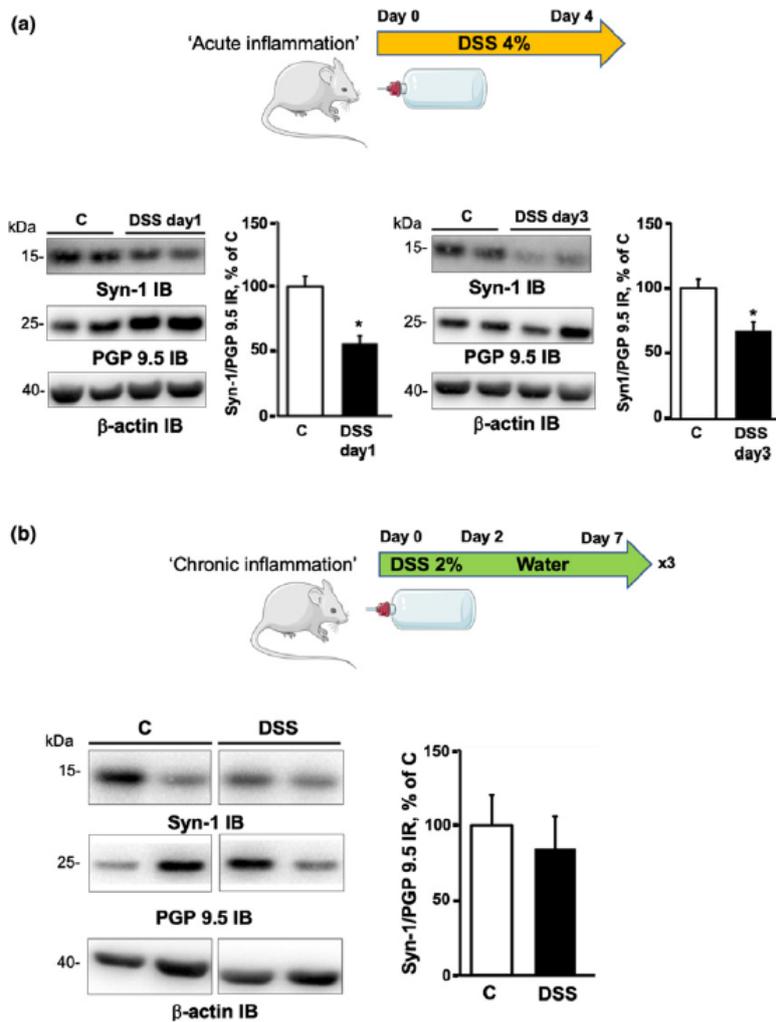


Fig. 5 Alpha-synuclein expression in the colon of mice with DSS-induced colitis. (a) Acute colitis was induced in mice by 4% DSS in the drinking water for 4 days. Lysates from colonic samples from day 1 to day 4 were subjected to immunoblot analysis using Syn-1, PGP 9.5 and beta-actin antibodies. Values represent mean \pm SEM ($n = 5$ per condition and per day; treated vs. control $*p < 0.05$). (b) Chronic colitis was obtained by three cycles of 2% DSS in drinking water for 2 days followed by 5 days of water. Lysates from colonic samples at day 18 were subjected to immunoblot analysis using Syn-1, PGP 9.5 and beta-actin antibodies. Values represent mean \pm SEM ($n = 10$ per condition).

regulation of alpha-synuclein expression in enteric neurons. By contrast to primary cortical neurons, two different p38 inhibitors dramatically increased the expression levels of alpha-synuclein in primary culture of ENS, thereby suggesting that the amount of alpha-synuclein is tonically down-regulated in enteric neurons via a p38 signaling pathway. In addition, we showed that the effects of either TI or LPS on enteric alpha-synuclein expression were completely reverted in the presence of the p38 inhibitor SB203580. Our current results, together with our previous findings (Paillusson *et al.* 2010), indicate that the ERK inhibitor U0126 and the p38 inhibitor SB203580 have an opposite effect on alpha-synuclein expression in primary culture of ENS, inducing a down- and up-regulation of alpha-synuclein, respectively. They therefore strongly support the existence of a cellular signaling network in enteric neurons in which alpha-synuclein expression level is regulated by a cross-talk between ERK and p38.

In order to extend our results obtained *in vitro*, we studied the expression levels of alpha-synuclein in the colon of mice with DSS-induced acute colitis. Acute, chronic, and relapsing models of intestinal inflammation can be achieved by modifying the concentration of DSS as well as the frequency of administration and clinical signs of disease appear as soon as 1 day post-treatment, with an increased expression of the main pro-inflammatory cytokines (Yan *et al.*, 2009). In agreement with our results obtained *in vitro*, we observed a decreased expression of alpha-synuclein in the acute model of DSS-induced acute colitis. By contrast, when a more chronic administration regimen was used, we did not observe any change in the alpha-synuclein levels. Such a discrepancy might be explained by the lower levels of colonic pro-inflammatory cytokines that were found in this model when compared to the acute regimen (Garrido-Gil *et al.* 2018). These observations further reinforce the possible role of pro-inflammatory cytokines and especially TNF- α and IL1- β in

the regulation of enteric alpha-synuclein level. In further experiments, it will be interesting to study if alpha-synuclein is up-regulated in a model of slowly progressive colitis that can be induced by administering 4–5 repeated cycles of DSS.

At first glance, our results seem at odds with two recently published studies that reported an increase in alpha-synuclein levels in humans with either acute or chronic GI inflammation (Stolzenberg *et al.* 2017; Prigent *et al.* 2018). In children who received intestinal transplant, norovirus infection induced a marked and persistent elevation in alpha-synuclein in the upper-GI tract (Stolzenberg *et al.* 2017). We recently showed that the expression levels of alpha-synuclein is increased in patients with chronic inflammatory disorders of the GI tract, such as Crohn's disease (Prigent *et al.* 2018). A possible explanation for the discrepancy between these results and our current findings may be related to the mechanisms involved in the regulation of alpha-synuclein levels in each model. As suggested by Stolzenberg *et al.* (2017), the greater amount of alpha-synuclein observed in the mucosa of norovirus-infected children likely results from a mobilization of the protein within the ENS, which is part of a normal immune defense mechanism. Regarding Crohn's disease, our unpublished results suggest that the up-regulation of alpha-synuclein is not transcriptionally mediated but is instead due to a decrease in protein degradation.

On the basis of increasing evidence showing that PD patients exhibit inflammation in the gut (Devos *et al.* 2013), several authors have proposed a model for PD pathogenesis. In such a model, an hitherto unknown pathogen triggers intestinal inflammation, which in turn would induce intestinal hyperpermeability, to increase the expression and aggregation of alpha-synuclein in neurons of the submucosal plexus whose terminal axons are only micrometers away from the gut lumen (Lema Tomé *et al.* 2013; Houser and Tansey 2017). The pathological process would further spread to the CNS via the vagal preganglionic innervation of the gut, as this has been already demonstrated for prion (Kujala *et al.* 2011) and neural tracers (Walter *et al.* 2009). In this context, our results suggest that if alpha-synuclein is up-regulated by GI inflammation in PD, it is not through a direct increase in protein synthesis. Therefore, at this time, it remains unclear whether the observed changes in inflammatory markers in PD patients are an initial occurrence that contributes to the development of the disease, or if they emerge in response to PD-related pathology in the enteric neurons or enteric glial cells (Beach *et al.* 2010; Clairembault *et al.* 2014).

Authors contributions

AP and JG performed the experiments and analyzed the data. TD, MRD, and CLS performed the experiments. MRD, MN, and PD designed the research. PD analyzed the data and wrote the manuscript.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

This work was supported by a grant of CECAP (comité d'entente et de coordination des associations de parkinsoniens) to AP and PD, FFGP (Fédération Française des Groupements de Parkinsoniens) et Parkinsoniens de Vendée to PD, and France Parkinson to PD. The authors have no conflict of interest to declare.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

Open science badges

This article has received a badge for *Open Materials* because it provided all relevant information to reproduce the study in the manuscript. The complete Open Science Disclosure form for this article can be found at the end of the article. More information about the Open Practices badges can be found at <https://cos.io/our-services/open-science-badges/>.

Supporting information

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

Figure S1. Distribution and localization of alpha-synuclein in primary culture of rat ENS under basal condition and after treatment with LPS.

Figure S2. Expression of TLR4 receptors in primary culture of rat ENS and primary culture of cortical CNS neurons.

Figure S3. (a and b) Effects of LPS- and TNF- α /IL1- β on JNK signaling pathway. (c) Effects of JNK inhibitor on alpha-synuclein expression.

Figure S4. Effects of the p38 inhibitors SB203580 and BIRB 796 on HSP27 phosphorylation.

Figure S5. Inflammation observed in the colon of mice with DSS-induced colitis.

References

- Beach T. G., Adler C. H., Sue L. I. *et al.*; Arizona Parkinson's Disease Consortium (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.*, **119**, 689–702.
- Chartier-Harlin M.-C., Kachergus J., Roumier C. *et al.* (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1167–1169.
- Chen S. G., Stribinskis V., Rane M. J. *et al.* (2016) Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged Fischer 344 rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Rep.* **6**, 34477.
- Choi J. G., Kim N., Ju I. G., Eo H., Lim S.-M., Jang S.-E., Kim D.-H. and Oh M. S. (2018) Oral administration of *Proteus mirabilis* damages dopaminergic neurons and motor functions in mice. *Sci. Rep.* **8**, 1275.
- Clairembault T., Kamphuis W., Leclair-Visonneau L., Rolli-Derkinderen M., Coron E., Neunlist M., Hol E. M. and Derkinderen P. (2014)

- Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **130**, 805–815.
- Clough R. L. and Stefanis L. (2007) A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein. *FASEB J.* **21**, 596–607.
- Coquenlorge S., Duchalais E., Chevalier J., Cossais F., Rolli-Derkinderen M. and Neunlist M. (2014) Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J. Neuroinflammation* **11**, 202.
- Corbillé A.-G., Neunlist M. and Derkinderen P. (2016) Cross-linking for the analysis of α -synuclein in the enteric nervous system. *J. Neurochem.* **139**, 839–847.
- Cuenda A., Rouse J., Doza Y. N., Meier R., Cohen P., Gallagher T. F., Young P. R. and Lee J. C. (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**, 229–233.
- Derkinderen P., Rouaud T., Lebouvier T., Bruley des Varannes S., Neunlist M. and De Giorgio R. (2011) Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology* **77**, 1761–1767.
- 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.
- Devine M. J., Gwinn K., Singleton A. and Hardy J. (2011) Parkinson's disease and α -synuclein expression. *Mov. Disord.* **26**, 2160–2168.
- Devos D., Lebouvier T., Lardeux B. *et al.* (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **50**, 42–48.
- Edwards L. L., Quigley E. M. and Pfeiffer R. F. (1992) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* **42**, 726–732.
- Garrido-Gil P., Rodriguez-Perez A. I., Dominguez-Meijide A., Guerra M. J. and Labandeira-Garcia J. L. (2018) Bidirectional neural interaction between central dopaminergic and gut lesions in Parkinson's disease models. *Mol. Neurobiol.* **55**, 7297–7316.
- Gelpi E., Navarro-Otano J., Tolosa E. *et al.* (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov. Disord.* **29**, 1010–1018.
- Gougeon P.-Y., Lourenssen S., Han T. Y., Nair D. G., Ropeleski M. J. and Blennerhassett M. G. (2013) The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α are neurotrophic for enteric neurons. *J. Neurosci.* **33**, 3339–3351.
- Gründemann J., Schlaudraff F., Haackel O. and Liss B. (2008) Elevated alpha-synuclein mRNA levels in individual UV-laser-microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson's disease. *Nucleic Acids Res.* **36**, e38.
- Hotamisligil G. S. and Davis R. J. (2016) Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a006072.
- Houser M. C. and Tansey M. G. (2017) The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinsons Dis.* **3**, 3.
- Houser M. C., Chang J., Factor S. A., Molho E. S., Zabetian C. P., Hill-Burns E. M., Payami H., Hertzberg V. S. and Tansey M. G. (2018) Stool immune profiles evince gastrointestinal inflammation in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **33**, 793–804.
- Ibáñez P., Bonnet A.-M., Débarges B., Lohmann E., Tison F., Pollak P., Agid Y., Dürr A. and Brice A. (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1169–1171.
- Inoue Y., Tsushima H., Ando K. *et al.* (2006) Chemokine expression in human erythroid leukemia cell line AS-E2: macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 is induced by inflammatory cytokines. *Exp. Hematol.* **34**, 19–26.
- Krüger R., Kuhn W., Müller T., Woitalla 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.
- Kujala P., Raymond C. R., Romeijn M., Godsave S. F., van Kasteren S. I., Wille H., Prusiner S. B., Mabbott N. A. and Peters P. J. (2011) Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog.* **7**, e1002449.
- 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.
- Leclair-Visonneau L., Magy L., Volteau C. *et al.* (2018) Heterogeneous pattern of autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **265**, 933–941.
- Lema Tomé C. M., Tyson T., Rey N. L., Grathwohl S., Britschgi M. and Brundin P. (2013) Inflammation and α -synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease—is there a link? *Mol. Neurobiol.* **47**, 561–574.
- Mittal S., Bjørnevik K., Im D. S. *et al.* (2017) β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science* **357**, 891–898.
- Paillusson S., Tasselli M., Lebouvier T., Mahé M. M., Chevalier J., Biraud M., Cario-Toumaniantz C., Neunlist M. and Derkinderen P. (2010) α -Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J. Neurochem.* **115**, 694–706.
- Pargellis C., Tong L., Churchill L. *et al.* (2002) Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 268–272.
- Perrin R. J., Payton J. E., Bamett D. H., Wraight C. L., Woods W. S., Ye L. and 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.
- Peter I., Dubinsky M., Bressman S., Park A., Lu C., Chen N. and Wang A. (2018) Anti-tumor necrosis factor therapy and incidence of Parkinson disease among patients with inflammatory bowel disease. *JAMA Neurol.* **75**, 939–946.
- Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E. *et al.* (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045–2047.
- 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. Parkinsons Dis.* **5**, 765–772.
- Prigent A., Lionnet A., Durieu E., Chapelet G., Bourreille A., Neunlist M., Rolli-Derkinderen M. and Derkinderen P. (2018) Enteric alpha-synuclein expression is increased in Crohn's disease. *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1943-7>.
- Rideout H. J., Dietrich P., Savalle M., Dauer W. T. and Stefanis L. (2003) Regulation of alpha-synuclein by bFGF in cultured ventral midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* **84**, 803–813.
- Sasaki A., Arawaka S., Sato H. and Kato T. (2015) Sensitive western blotting for detection of endogenous Ser129-phosphorylated α -synuclein in intracellular and extracellular spaces. *Sci. Rep.* **5**, 14211.
- Schwartz A., Spiegel J., Dillmann U., Grundmann D., Bürmann J., Faßbender K., Schäfer K.-H. and Unger M. M. (2018) Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **50**, 104–107.
- Singleton A. B., Farrer M., Johnson J. *et al.* (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**, 841.
- 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.

- Stefanis L., Kholodilov N., Rideout H. J., Burke R. E. and Greene L. A. (2001) Synuclein-1 is selectively up-regulated in response to nerve growth factor treatment in PC12 cells. *J. Neurochem.* **76**, 1165–1176.
- Stolzenberg E., Berry D., Yang D. *et al.* (2017) A role for neuronal alpha-synuclein in gastrointestinal immunity. *J. Innate. Immun.* **9**, 456–463.
- Tanji K., Imaizumi T., Yoshida H., Mori F., Yoshimoto M., Satoh K. and Wakabayashi K. (2001) Expression of alpha-synuclein in a human glioma cell line and its up-regulation by interleukin-1beta. *NeuroReport* **12**, 1909–1912.
- Villumsen M., Aznar S., Pakkenberg B., Jess T. and Brudek T. (2018) Inflammatory bowel disease increases the risk of Parkinson's disease: a Danish nationwide cohort study 1977-2014. *Gut* **68**, 18–24.
- Voss U. and Ekblad E. (2014) Lipopolysaccharide-induced loss of cultured rat myenteric neurons – role of AMP-activated protein kinase. *PLoS ONE* **9**, e114044.
- 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.* **76**, 217–221.
- Walter G. C., Phillips R. J., Baronowsky E. A. and Powley T. L. (2009) Versatile, high-resolution anterograde labeling of vagal efferent projections with dextran amines. *J. Neurosci. Methods* **178**, 1–9.
- Wang C.-P., Li J.-L., Zhang L.-Z., Zhang X.-C., Yu S., Liang X.-M., Ding F. and Wang Z.-W. (2013) Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via suppression of TLR4-NF-kB signal pathway. *Neurochem. Int.* **63**, 741–749.
- Yan Y., Kolachala V., Dalmasso G., Nguyen H., Laroui H., Sitaraman S. V. and Merlin D. (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One.* **4**, e6073.
- Zarranz J. J., Alegre J., Gómez-Esteban J. C. *et al.* (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* **55**, 164–173.

ARTICLE 2 :

Enteric α -synuclein expression is increased in Crohn's disease.



Enteric alpha-synuclein expression is increased in Crohn's disease

Alice Prigent^{1,2,3} · Arthur Lionnet^{1,2,4} · Emilie Durieu^{1,2,3} · Guillaume Chapelet^{1,2} · Arnaud Bourreille^{1,2,3} · Michel Neunlist^{1,2,3} · Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,2,3} · Pascal Derkinderen^{1,2,4}

Received: 8 October 2018 / Revised: 27 November 2018 / Accepted: 28 November 2018 / Published online: 30 November 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

An accumulating body of evidence has emerged in the last decade to suggest that gastrointestinal (GI) inflammation might be involved in the development of Parkinson's disease (PD). Elevated levels of proinflammatory cytokines [3] and fecal markers of inflammation have been reported in PD patients [5]. Data from genetic studies further support the close relationship between PD and GI inflammation as PD and Crohn's disease (CD) share common causative and susceptibility genes such as leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) and nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) (reviewed in [2]). Two recent large epidemiological studies, by showing an increased risk of subsequent PD in patients with inflammatory bowel disease (IBD) when compared with non-IBD subjects, tie even closer together these two disorders [4, 7].

The mechanisms by which gastrointestinal inflammation might influence PD development or progression are still unclear. A recent report showed that viral-induced gastrointestinal inflammation is associated with alpha-synuclein upregulation in the upper gastrointestinal tract [6]. In the context of PD, this observation suggests that a sustained low-grade inflammation might increase alpha-synuclein expression and aggregation in the submucosal neurons

whose terminal axons are only micrometers away from the gut lumen, thereby initiating or worsening the pathological process. The recent findings demonstrating both epidemiological and genetic links between PD and IBD logically led us to study the expression levels and aggregation of alpha-synuclein in the GI tract of IBD patients with either CD or ulcerative colitis (UC).

For biochemical analysis, a total of 34 subjects participated in this study: 10 CD and 12 UC patients with an active disease, as well as 12 healthy controls who had a normal colonoscopy for colorectal cancer screening (see suppl. Table 1 [Online Resource 1] for subjects' demographics and treatments). IBD patients had 4 biopsies (2 in an inflamed and 2 in a non-inflamed area) taken during the course of a colonoscopy. Biopsies were analyzed by Western-Blot and filter-trap assay (see Online Resource 2 for further details on the methods). For immunohistochemical analysis, full-thickness segments of colon containing the myenteric plexus were obtained from 8 IBD patients (4 CD and 4 UC) and from 4 controls who underwent colonic resection for disease management and non-obstructive colorectal carcinoma, respectively (Online Resource 2).

A significant 2.07- and 2.35-fold increase in the expression levels of alpha-synuclein protein was observed in the non-inflamed and inflamed area of CD patients when compared to controls, respectively (Fig. 1a and suppl. Fig. 1 [Online Resource 3]). By contrast, no significant differences were observed between UC patients and controls (Fig. 1b and suppl. Fig. 1 [Online Resource 3]). Filter-trap assays were performed in samples from 6 controls, 6 CD and 6 UC patients to detect alpha-synuclein aggregates. Although our assay efficiently detected alpha-synuclein aggregates in a brain sample from a patient with dementia with Lewy bodies, it did not show any appreciable difference in the immunoreactivity for alpha-synuclein or phosphorylated alpha-synuclein between colonic samples from CD, UC and controls (Fig. 1c and suppl. Fig. 2 [Online Resource 4]). Additional immunohistochemistry experiments showed that alpha-synuclein immunoreactivity was increased in

Malvyne Rolli-Derkinderen and Pascal Derkinderen have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1943-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

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

¹ Inserm, U1235, Place Gaston Veil, 44035 Nantes, France

² University Nantes, Nantes 44035, France

³ CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes 44093, France

⁴ Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes 44093, France

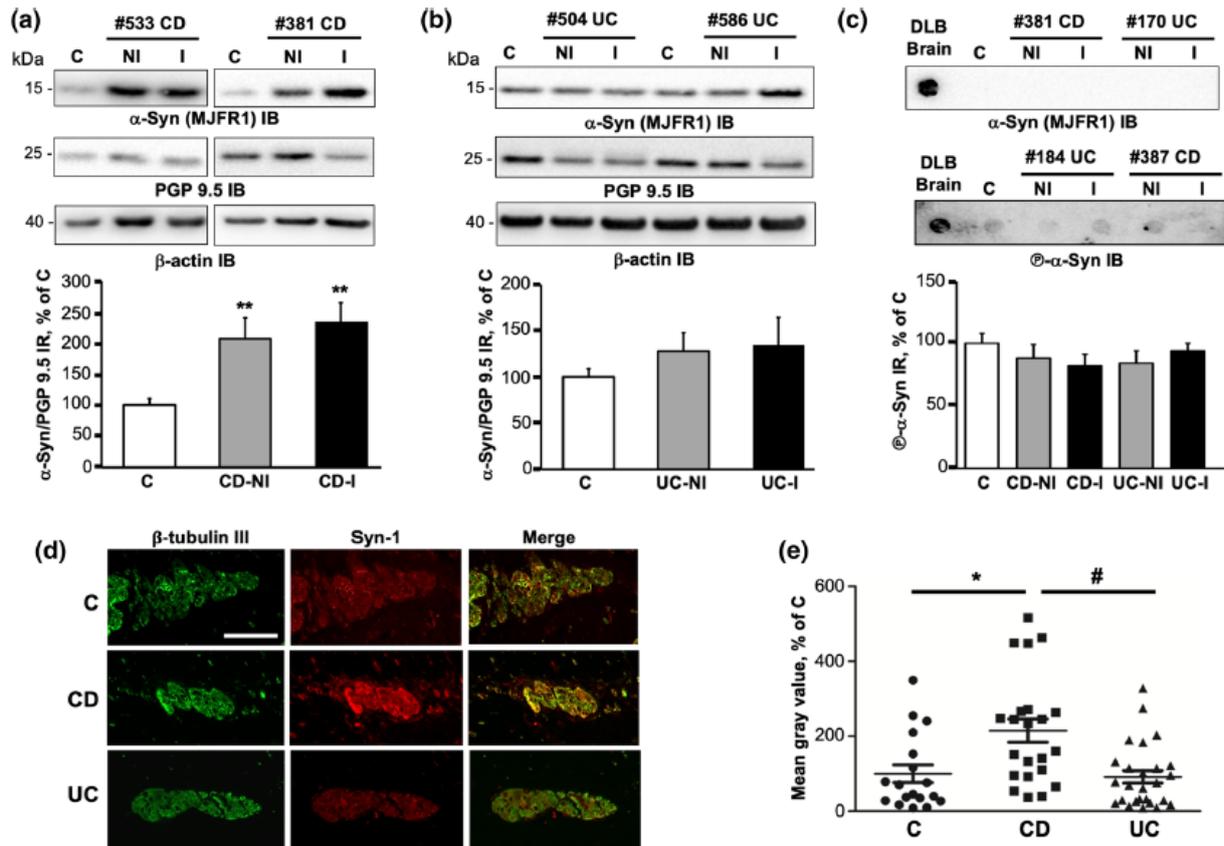


Fig. 1 Expression levels and aggregation of alpha-synuclein in colonic biopsies from patients with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). **a, b** Colonic biopsies lysates from 10 CD patients, 12 UC patients and 12 controls (C) (see suppl. Table 1 [Online Resource 1] for subjects' demographics and treatments) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against total alpha-synuclein (α -Syn MJFR1 IB) and PGP 9.5 (PGP 9.5 IB). For UC and CD patients, biopsies taken in non-inflammatory (NI, CD-NI and UC-NI) and inflammatory area (I, CD-I and UC-I) were analyzed separately. For one UC subject (#283), no biopsies were taken in the non-inflamed area. To ensure equal protein loading, membranes were probed with anti- β -actin antibody. Illustrative images are shown; raw immunoblots are provided in suppl. Fig. 1 [Online Resource 3]. Alpha-synuclein immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP 9.5 and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 12 samples for control subjects (C), 12 samples for UC patients in the inflamed area, 11

samples for UC patients in the non-inflamed area and 10 samples for CD patients in both inflamed and non-inflamed area, $**p < 0.005$. **c** Colonic biopsies lysates from 6 UC and CD patients and 6 controls (C) were subjected to filter-trap assay with cellulose acetate membrane using antibodies against total alpha-synuclein (α -Syn MJFR1 IB) and phosphorylated alpha-synuclein (α -Syn IB). Illustrative images are shown, raw results are provided in suppl. Fig. 2 [Online Resource 4]. Phosphorylated alpha-synuclein immunoreactive spots were measured and expressed as percentage of controls. **d** Anti-alpha-synuclein Syn-1 and anti- β -tubulin III antibodies were used to detect alpha-synuclein in the myenteric ganglia in CD and UC samples and in control subjects. Scale bar is 50 μ m. **e** Quantitative analysis of alpha-synuclein immunofluorescence in the myenteric plexus of CD, UC patients and controls. Data are shown as corrected mean gray value normalized to controls and presented as mean \pm SEM, $n = 18$, 22 and 26 myenteric ganglia for control, CD and UC group, respectively. $*p < 0.05$, CD vs C, $\#p < 0.05$, CD vs UC

myenteric neurons of CD patients when compared to UC patients and control subjects (Fig. 1d, e).

Our results show that alpha-synuclein protein levels are increased in the colon of CD, but not of UC patients and that this upregulation is not associated with more protein aggregation. These findings further reinforce the possible link between IBD and PD and the causal role of gastrointestinal inflammation in the development of PD. They also outline the fact that despite being grouped under the term

IBD and sharing overlapping symptoms and complications, UC and CD are two different disorders from a pathophysiological point of view. While CD is primarily associated with T-helper type 1 immune responses, UC predominantly shows a characteristic atypical T-helper type 2 cytokine pattern [1]. It is, therefore, tempting to speculate that some of the pro-inflammatory cytokines and/or para-inflammatory responses that are activated in CD but not in UC are involved in the regulation of alpha-synuclein expression. Further in vitro

studies are definitely needed to identify these signaling pathways and to study if they are shared between the central and enteric nervous system. Such an approach should help us better understand the role of systemic inflammation in PD.

Acknowledgements This work was supported by a grant from *centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens* (CECAP) and *Parkinsonien de Vendée* (FFGP) to AP and PD and *Institut de France* to PD.

Author's contribution AP, AL, ED, GC and MRD performed the experiments. AB, ED, MN and MRD were involved in tissue sampling and biobanking. MRD and PD supervised the study, wrote the first draft and the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards

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

References

1. Christophi GP, Rong R, Holtzapple PG, Massa PT, Landas SK (2012) Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 18:2342–2356. <https://doi.org/10.1002/ibd.22957>
2. Derkinderen P, Neunlist M (2018) Crohn's and Parkinson disease: is LRRK2 lurking around the corner? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0006-9>
3. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H et al (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 50:42–48. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.09.007>
4. Peter I, Dubinsky M, Bressman S, Park A, Lu C, Chen N et al (2018) Anti-tumor necrosis factor therapy and incidence of Parkinson disease among patients with inflammatory bowel disease. *JAMA Neurol*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0605>
5. Schwiertz A, Spiegel J, Dillmann U, Grundmann D, Bürmann J, Faßbender K et al (2018) Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.022>
6. Stolzenberg E, Berry D, Yang D, Lee EY, Kroemer A, Kaufman S et al (2017) A Role for neuronal alpha-synuclein in gastrointestinal immunity. *J Innate Immun* 9:456–463. <https://doi.org/10.1159/000477990>
7. Villumsen M, Aznar S, Pakkenberg B, Jess T, Brudek T (2018) Inflammatory bowel disease increases the risk of Parkinson's disease: a Danish nationwide cohort study 1977–2014. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315666>

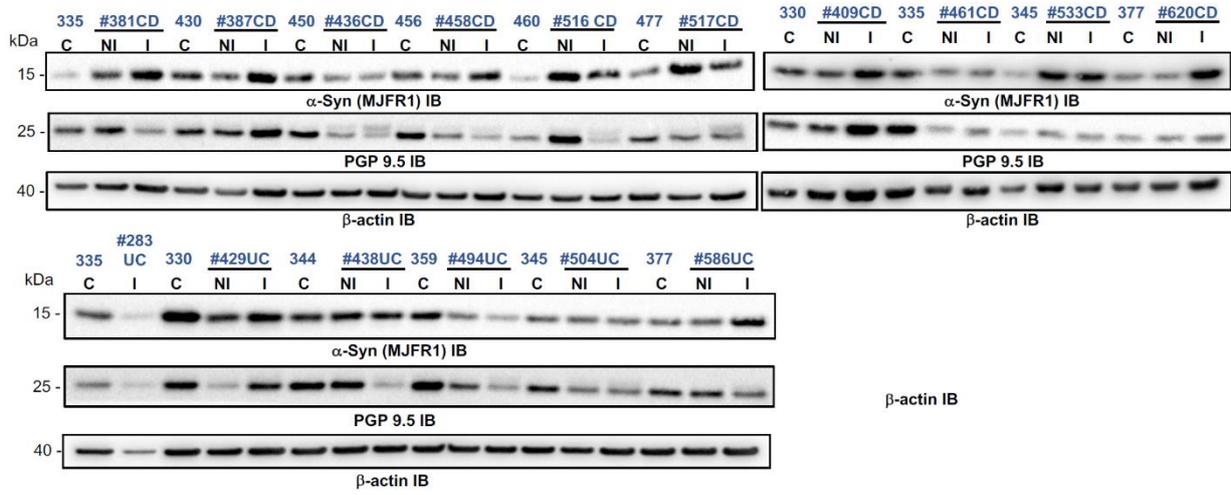
FIGURE SUPPLEMENTAIRE 1:

Patient #	Diagnosis	Age	Sex	Treatment
381	CD	34	M	IST
387	CD	43	F	Anti-TNF- α
409	CD	34	M	Anti-TNF- α
436	CD	20	M	Anti-TNF- α
458	CD	38	F	0
461	CD	35	M	Anti-TNF- α
516	CD	39	M	Anti-TNF- α ; IST
517	CD	22	M	Anti-TNF- α
533	CD	24	M	Anti-TNF- α ; IST
620	CD	38	F	0
139	UC	21	F	5-ASA
150	UC	27	M	Anti-TNF- α
170	UC	30	F	Anti-TNF- α ; IST
184	UC	52	M	Corticosteroids
223	UC	60	F	5-ASA; corticosteroids
225	UC	48	M	IST; corticosteroids
283	UC	31	F	5-ASA
429	UC	45	M	IST
438	UC	36	F	5-ASA
494	UC	37	F	Anti-TNF- α
504	UC	49	M	Anti-TNF- α ; 5-ASA
586	UC	38	M	Anti-TNF- α ; 5-ASA
330	Control	55	M	
335	Control	73	F	
344	Control	41	F	
345	Control	48	F	
359	Control	45	M	
377	Control	48	F	
428	Control	49	F	
430	Control	41	F	
450	Control	49	M	
456	Control	47	F	
460	Control	31	F	
477	Control	18	F	

Online Resource 1: subjects' demographics and treatments

5-ASA: 5-aminosalicylic acid; IST: immunosuppressive therapy

FIGURE SUPPLEMENTAIRE 2:



Online resource 3: Western blot experiments, raw data

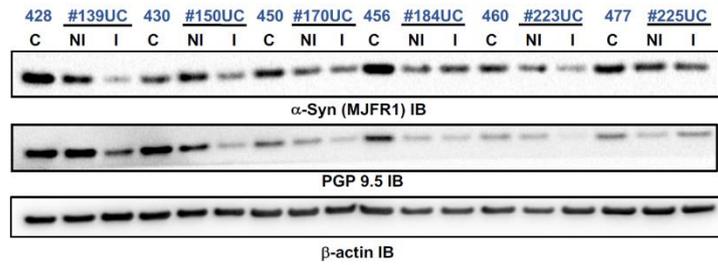
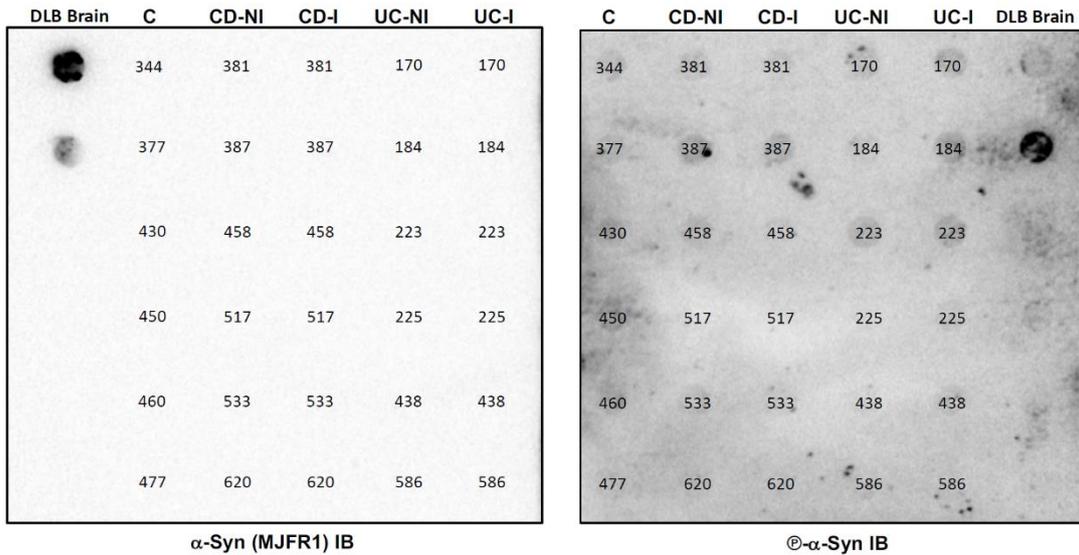


FIGURE SUPPLEMENTAIRE 3:



Online resource 4: filter trap assay, raw data

VII. Tau et tauopathies

7.1. La protéine Tau

7.1.1. Généralités

La protéine Tau a été découverte en 1975 et appartient à la famille des MAPs (*Microtubule Associated Proteins*) (Weingarten et al., 1975). Cette protéine neuronale est majoritairement exprimée dans le SNC et localisée dans les axones des neurones (Morris et al., 2011). Elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules cependant son hyperphosphorylation altère ses fonctions physiologiques et participe à la formation des filaments appariés en hélice (PHF) toxiques (Guo et al., 2017). Ces derniers peuvent ensuite s'agréger et donner les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), lésions intracellulaires neuronales conduisant à la dégénérescence progressive des neurones. Ces atteintes sont les caractéristiques des tauopathies, qui regroupent plus d'une vingtaine de pathologies dont les principales sont la maladie d'Alzheimer (MA), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale et la maladie de Niemann-Pick (Kovacs, 2018).

7.1.2. Les MAPs

Les MAPs sont des protéines d'association aux microtubules, qui se lient aux sous-unités de tubuline composant les microtubules afin de réguler leur stabilité et de médier leurs interactions avec les protéines du cytosquelette. Les principales MAPs assurant ces fonctions sont MAP1, MAP2, MAP4 et Tau, pour lesquelles on retrouve plusieurs isoformes exprimées dans de nombreux types cellulaires (Mohan and John, 2015). Les protéines MAP2 sont les plus abondantes parmi la famille des MAPs et sont impliquées dans la neuromorphogenèse et la pousse neuritique (Dehmelt and Halpain, 2005). On retrouve 4 isoformes obtenues par épissage alternatif : MAP2a, b, c et d. MAP2a et b sont exclusivement localisées dans les dendrites tandis que MAP2c est exprimée dans les axones. MAP2d est à la fois retrouvée dans les neurones et les cellules gliales (Mohan and John, 2015). Dans les neurones matures, les MAP2 sont associées aux microtubules afin de les stabiliser, et à l'actine dans les épines dendritiques, participant à la plasticité synaptique (Caceres et al., 1983; Morales and Fifkova, 1989).

7.1.3. Les différentes isoformes de Tau

La protéine Tau est codée par le gène MAPT (*Microtubule Associated Protein Tau*), localisé sur le chromosome 17, en position 17q21 (Neve et al., 1986). Le transcrit primaire contient 16 exons, mais tous ne sont pas traduits (Andreadis et al., 1992, 1995). En effet, il existe en conditions physiologiques dans le SNC, 6 isoformes de la protéine Tau qui sont obtenues par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (**figure**

14). Les exons 2 et 3 codent pour des inserts de 29 acides aminés, mais l'exon 3 n'est jamais transcrit sans l'exon 2. La présence de zéro, un ou deux inserts des exons 2 et 3 dans la région N-terminale de la protéine vont donner les formes 0N, 1N et 2N, respectivement. De plus, la présence en C-terminale de trois (épissage de l'exon 10) ou quatre (avec l'exon 10) domaines de liaisons aux microtubules va donner les isoformes 3R et 4R, respectivement. On retrouve ainsi, après épissage alternatif, les six isoformes suivantes : 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R (**figure 14**) (Goedert et al., 1989a). En Western Blot, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ces 6 isoformes migrent entre 45 kDa et 65 kDa (**figure 14**) (Himmler et al., 1989).

L'expression des protéines Tau est régulée au cours du développement. En effet, après la naissance, on ne retrouve qu'une seule isoforme fœtale, ne comportant pas les inserts des exons 2, 3 ou 10 (0N3R), tandis que les 6 isoformes sont présentes à l'âge adulte dans le SNC, ce qui suggère un rôle spécifique de chacune des isoformes (Goedert and Jakes, 1990; Kosik et al., 1989; Takuma et al., 2003).

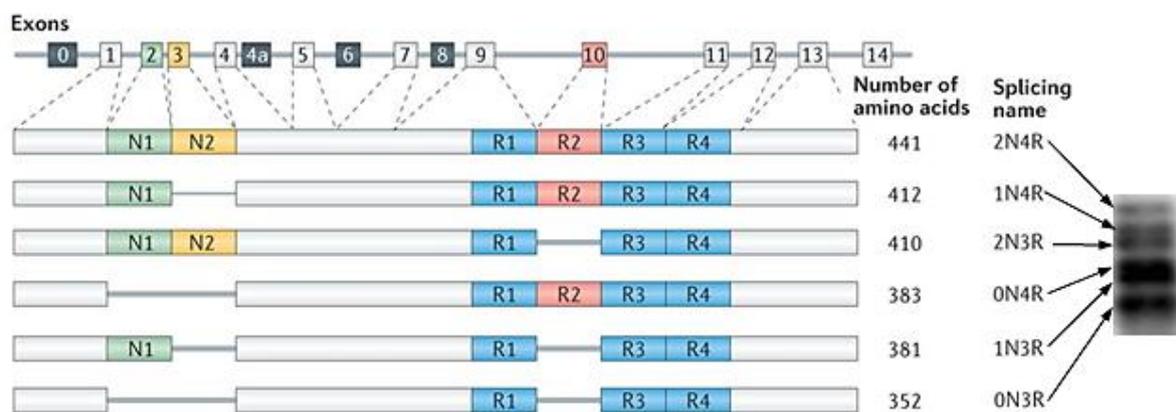


Figure 14 : Le gène MAPT et les isoformes de Tau obtenues par épissage alternatif dans le cerveau humain. Les six isoformes de la protéine tau (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R) sont générées par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. A droite est présenté le profil migratoire des 6 isoformes recombinantes de tau par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. D'après (Wang and Mandelkow, 2016)

7.1.4. Structure de Tau

En conditions physiologiques, la protéine Tau est une protéine hautement hydrophile, flexible et est retrouvée sous forme non structurée et non repliée en solution. Elle contient deux domaines distincts : le **domaine de projection** et le **domaine de liaison aux microtubules** (**Figure 15**).

Le **domaine de projection** comporte une région acide en N-terminale, regroupant les inserts des exons 2 et 3, suivie d'une région riche en proline. La longueur de ce domaine est variable et dépend du nombre d'inserts, composés chacun de 29 acides aminés. Ce domaine de projection est responsable des nombreuses interactions de Tau avec le cytosquelette et la membrane plasmique.

Le **domaine de liaison aux microtubules** contient les 3 ou 4 régions répétées, donnant respectivement les isoformes 3R et 4R. Ces motifs répétés sont composés de 18 acides aminés, séparés entre eux par 13 ou 14 acides aminés (Goedert et al., 1989b; Himmler et al., 1989). Ce domaine intervient dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules ainsi que le transport axonal (Brandt and Lee, 1993; Lee et al., 1989; Weingarten et al., 1975).

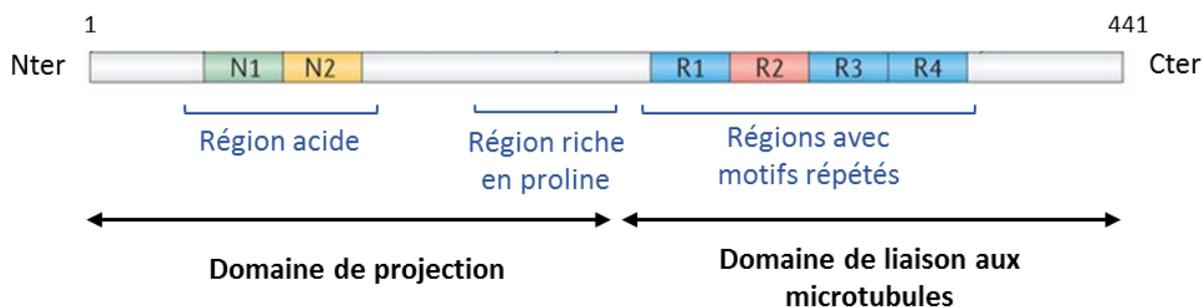


Figure 15 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de l'isoforme tau la plus longue (2N4R). Le domaine de projection, comprenant une région acide et riche en proline, interagit avec des éléments du cytosquelette et détermine l'espacement entre les microtubules dans les axones. La partie N-terminale est également impliquée dans les voies de transduction des signaux en interagissant avec les protéines PLC- γ et Src-kinases. La partie C-terminale, appelée domaine de liaison aux microtubules, régule le taux de polymérisation et la stabilisation des microtubules. Adapté de Wang and Mandelkow, 2016.

7.1.5. Localisation et fonctions

En conditions physiologiques dans le SNC, Tau est une protéine intracellulaire principalement exprimée dans les axones des neurones (Morris et al., 2011) et en plus faible quantité dans les compartiments somatodendritiques (Tashiro et al., 1997), incluant les dendrites, la membrane plasmatique, le noyau et les mitochondries (Li et al., 2016). Elle exerce ainsi un rôle différent en fonction de sa localisation subcellulaire.

➤ Tau cytosolique et axonale

Les microtubules forment, avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, les protéines du cytosquelette. Les microtubules jouent un rôle essentiel dans la morphologie axonale et le transport de macromolécules et organites entre le soma et les extrémités axonales du neurone. Les hétérodimères d' α - et β -tubuline s'assemblent en protofilaments puis se polymérisent afin de former les microtubules de 25 μ m de diamètre. Ces microtubules ont une extrémité négative et l'autre positive, rendant leur conformation dynamique et permettant un équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des dimères de tubuline (**Figure 16**) (Arendt et al., 2016). Grâce à son domaine de liaison aux microtubules, contenant les 3 ou 4 régions répétées, la protéine Tau facilite la **polymérisation et la stabilisation des**

microtubules. Il est intéressant de noter que les isoformes 4R ont une plus grande affinité pour les microtubules et les stabilisent davantage que les isoformes 3R (Goedert and Jakes, 1990).

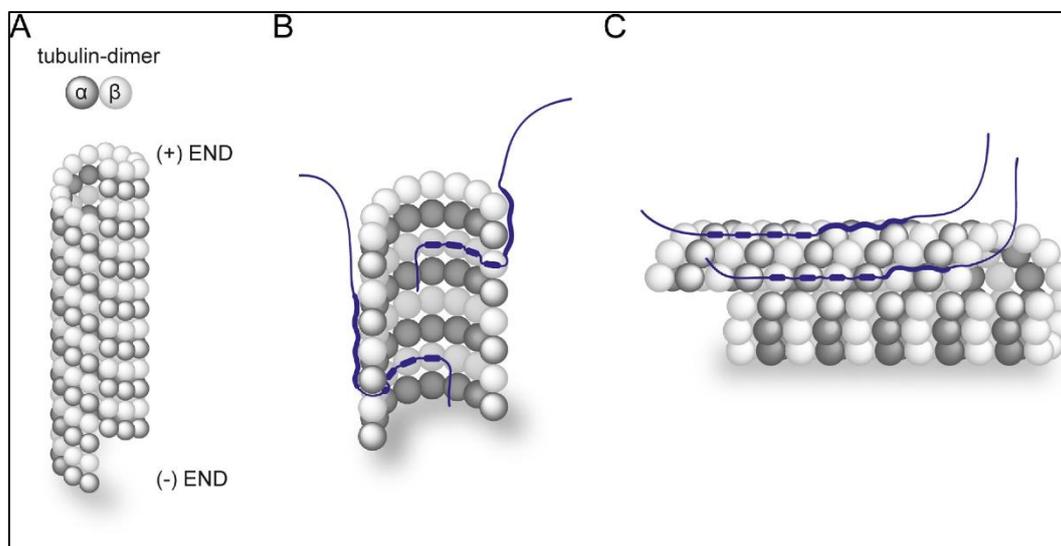


Figure 16 : La dynamique et stabilisation des microtubules. (A) Les microtubules sont formées dynamiquement par l'assemblage de dimères de tubuline à l'extrémité positive du protofilament. Un dimère de tubuline se compose d'une sous-unité α - et d'une sous-unité β -tubuline. La liaison de la protéine tau aux microtubules est médiée par son domaine de liaison aux microtubules. Toutefois, différents modèles de reliure sont proposés. (B) La liaison des microtubules se répète sur la face interne tandis que la région riche en proline interagit avec la surface des microtubules. Le domaine N-terminal se projette loin du microtubule. (C) Toute la molécule tau se lie latéralement à la surface des microtubules, formant ainsi un pont entre les différents dimères de tubuline. La liaison de la protéine tau aux microtubules est notamment régulée par sa phosphorylation. D'après Arendt et al., 2016.

Le transport axonal est assuré par les protéines motrices dynéine et kinésine, qui migrent le long des rails des microtubules et assurent le transport rétrograde (vers l'extrémité -) et antérograde (vers l'extrémité +) des macromolécules le long des axones, respectivement. La stabilisation des microtubules par la protéine Tau participe donc au bon fonctionnement du **transport axonal**.

Par ailleurs, dans les axones, le domaine de projection de Tau joue également un rôle important. En effet, il permet à la protéine Tau de se lier à la spectrine, aux filaments d'actine, organelles cytoplasmiques, et aux membranes plasmiques (Aamodt and Williams, 1984; Brandt et al., 1995; Carlier et al., 1984; Griffith and Pollard, 1982). Il détermine également les distances entre les microtubules dans l'axone et peut influencer le diamètre axonal (Chen et al., 1992). Il convient de noter que dans les neurones périphériques qui projettent souvent un très long axone de grand diamètre, une séquence N-terminale supplémentaire encodée par exon 4A est présente, générant une isoforme Tau spécifique appelé « big Tau » (Andreadis et al., 1992; Georgieff et al., 1993). Ces résultats suggèrent que la région N-terminale des protéines Tau joue un rôle important dans la **stabilisation et l'organisation de certains types d'axones**.

➤ **Tau associée à la membrane plasmique**

Le domaine de projection de Tau lui permet de nombreuses associations, incluant la liaison aux membranes plasmiques (Brandt et al., 1995). Cependant, il a été montré que son domaine C-terminal peut lui aussi se lier à la bicouche lipidique des membranes (Georgieva et al., 2014). Par l'intermédiaire de sa région riche en proline, Tau interagit avec les phospholipases C et les kinases Src, entraînant **la transduction de signaux** et l'activation de plusieurs voies de signalisation (Hwang et al., 1996; Lee et al., 1998).

➤ **Tau nucléaire**

La présence de Tau dans le noyau a été observée dans de nombreux types cellulaires et modèles, incluant le cerveau de patients témoins et atteints de MA, les cellules de glioblastomes humaines et de rats, et les lignées cellulaires humaines non neuronales (Loomis et al., 1990). Des études suggèrent que l'on retrouve Tau majoritairement sous sa forme non phosphorylée dans le noyau. Dans le compartiment nucléaire, Tau a la capacité de se lier à l'ADN et préviendrait les dommages à l'ADN induits par des chocs thermiques ou les radicaux libres, en limitant l'oxydation de l'ADN (Camero et al., 2014; Sultan et al., 2011). Ainsi, sa localisation nucléaire interviendrait dans le **maintien et l'intégrité de l'ADN**.

7.1.6. La phosphorylation de Tau

La protéine Tau est une protéine sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont la principale et la plus importante est la phosphorylation. En effet, Tau possède 85 sites potentiels de phosphorylation, sur sa forme la plus longue 2N4R. Parmi ces sites, on retrouve 45 résidus sérines, 35 thréonines et 5 tyrosines, qui représentent chacun 53, 41, and 6% des résidus phosphorylables sur Tau, respectivement (Hanger et al., 2009). Les états de phosphorylation et déphosphorylation de Tau font intervenir de nombreuses kinases et phosphatases sur ces différents sites.

➤ **Les kinases**

Les kinases sont des enzymes du groupe des transférases qui catalysent la réaction de phosphorylation en transférant, à partir de l'ATP, un groupement phosphate sur une autre molécule. On retrouve trois principaux groupes de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau : Les **PDPK** (*proline directed serine/threonine protein kinases*), les **non PDPK**, et les protéines kinases spécifiques des résidus tyrosine. La plupart des kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau font partie de la famille des **PDPK**. Ces dernières phosphorylent les résidus sérines et thréonine qui sont directement suivis d'un résidu proline. Elles comprennent les *Mitogen-activated protein kinases* (**MAPK**), la *glycogène synthase kinase 3* (**GSK3**), la *tau tubuline kinase* (**TTBK**), la *Cyclin-dependent kinase 5* (**cdk5**), ainsi que les *Stress*

Activated Protein Kinases (SAPK) (Baumann et al., 1993; Hanger et al., 1992; Reynolds et al., 2002; Takahashi et al., 1995; Vulliet et al., 1992).

Les sites non Ser/Thr-Pro peuvent être phosphorylés par de nombreuses autres kinases protéiques, comprenant la *microtubule affinity-regulating kinase (MARK)*, la *tau tubuline kinase (TTBK)*, la *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMPK II)*, la *cAMP-dependent protein kinase A (PKA)* et la caséine kinase I (**CKI**) (Drewes et al., 1997; Greenwood et al., 1994; Jicha et al., 1999; Johnson, 1992).

Le troisième groupe représente les kinases capables de phosphoryler les résidus tyrosine de la protéine Tau en position Tyr18, Tyr29, Tyr197, Tyr310, and Tyr394 (Lebouvier et al., 2009). On retrouve les kinases de la famille **Src** et les **Abl** (Derkinderen et al., 2005; Reynolds et al., 2008).

➤ **Les phosphatases**

Les phosphatases sont les enzymes qui catalysent les réactions de la déphosphorylation, par hydrolyse d'un groupement phosphate. Contrairement aux kinases, les phosphatases sont moins spécifiques et peuvent hydrolyser de nombreux résidus. La déphosphorylation de Tau s'effectue par les **PPP** (*Phospho Protein Phosphatase*), regroupant la PP1, PP2A, PP2B et PP5 (Liu et al., 2005; Yamamoto et al., 1988). L'activité de PP2A représente 70% de l'activité des phosphatases dans le SNC (Liu et al., 2005).

➤ **Rôle de la phosphorylation sur la régulation de Tau**

Le taux de phosphorylation module les fonctions de la protéine Tau et joue un rôle primordial dans sa liaison aux microtubules. En conditions pathologiques, on discerne l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale, qui correspondent à l'augmentation de la phosphorylation sur des sites normalement phosphorylés et la phosphorylation de sites qui ne le sont pas en conditions physiologiques, respectivement. De nombreuses sondes immunologiques ont été mises au point afin de détecter spécifiquement ces différents sites phosphorylés. On retrouve, pour les sites normaux de phosphorylation, les anticorps **PHF-1/PHF-13/AD2** (Ser396 ou Ser404), **AT8** (Ser202-Thr205), **AT180** (Thr231), **AT270** (Thr181) et **12E8** (Ser262 ou Ser356), et pour les sites pathologiques, les anticorps **AT100** (Thr212 ; Ser214), **PHF-27 /TG3** (Thr231 ; Ser235) et **AP422** (Ser442) (**figure 17**).

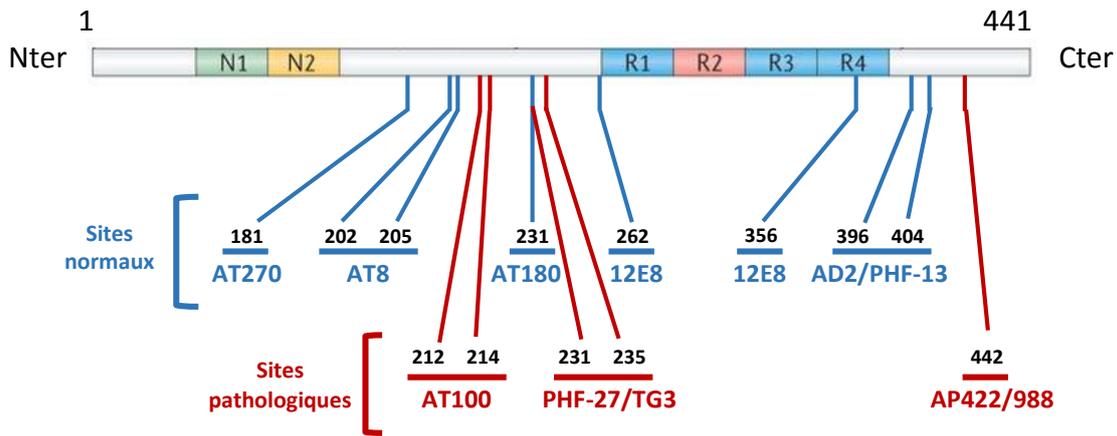


Figure 17 : Schéma représentant les principaux sites de phosphorylation des protéines tau et les anticorps les reconnaissant. Il existe 85 sites potentiels de phosphorylation sur la protéine Tau. Certains sont des sites « normaux » de phosphorylation reconnus par des anticorps anti-tau dépendant de la phosphorylation (AD2, AT8, AT180, AT270 et 12E8). Les sites dits pathologiques représentent la phosphorylation de sites qui ne le sont pas en conditions physiologiques et sont reconnus par les anticorps AT100, PHF-27/TG-3 et AP422/988. Adapté de L. Buée et A. Delacourte, 2002.

La phosphorylation de Tau joue un rôle essentiel sur sa liaison aux microtubules. Lorsque Tau est peu phosphorylée, elle se lie fortement aux microtubules et les stabilise. En revanche, l'augmentation de la phosphorylation des résidus Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356, sites normaux localisés sur les quatre domaines de liaison, diminue l'affinité de Tau pour les microtubules (Drewes et al., 1995). De la même façon, la phosphorylation pathologique des résidus Thr212, Ser214, Thr231 et Ser235 sur la région riche en proline, mise en évidence par les anticorps AT100 et PHF-27 respectivement, affecte la liaison des protéines Tau pour les microtubules (Ksiezak-Reding et al., 2003; Sengupta et al., 1998). Des études montrent que la phosphorylation sur le résidu Ser262 du domaine de liaison n'est pas suffisante pour induire le détachement de Tau des microtubules, suggérant que la phosphorylation de plusieurs sites serait nécessaire et que la région riche en proline pourrait jouer un rôle synergique (Seubert et al., 1995). Ainsi, la phosphorylation de ces sites diminue la liaison de Tau aux microtubules, leur stabilité et entraîne la dépolymérisation des protofilaments de tubulines, ce qui altère la structure et le transport axonal. Par ailleurs, la phosphorylation de Tau par la kinase GSK 3 altérerait le transport antérograde d'organelles le long des microtubules (Tatebayashi et al., 2004).

En plus de ces nombreux anticorps reconnaissant spécifiquement des sites phosphorylés, l'anticorps Tau-1 est souvent employé pour détecter le niveau de phosphorylation de la protéine Tau. Ce dernier se fixe sur la séquence déphosphorylée des acides aminés 189 à 207 (Buée et al., 2000). Ainsi, par analyse en Western Blot, une faible immunoréactivité de l'anticorps Tau-1 reflète une plus forte phosphorylation de Tau. L'utilisation de Tau-1 a permis de montrer que la phosphorylation de Tau inhibait sa capacité à se lier aux membranes lipidiques, et impactait la transduction de signaux dans les synapses (Arrasate et al., 2000). L'utilisation de Tau-1 a également permis de mettre en évidence que Tau nucléaire

est majoritairement déphosphorylée (Loomis et al., 1990), et que cet état favoriserait sa liaison à l'ADN (Qi et al., 2015) et préviendrait les dommages de l'ADN liés aux chocs thermiques et aux radicaux (Camero et al., 2014).

L'analyse des agrégats de la protéine Tau dans les lésions cérébrales de patients atteints de différentes tauopathies a révélé que Tau était, entre autres, hyperphosphorylée sur ses résidus Ser396-Ser404 et Ser202-Thr205, sites reconnus par les anticorps PHF-1/PHF-13/AD2 et AT8, respectivement, montrant que ces anticorps reconnaissent les formes pathologiques de Tau (**Figure 18**).

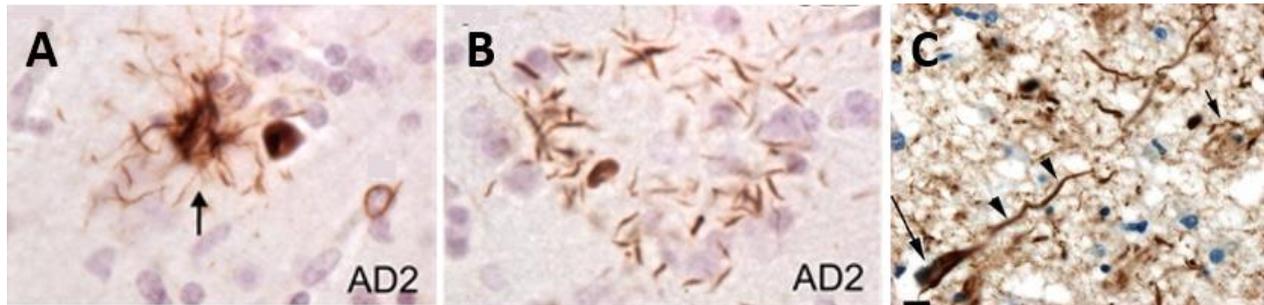


Figure 18 : Différentes lésions observées dans les Tauopathies. Présence d'une touffe gliale (A) et d'une plaque astrocytaire (B) observées par marquage immunohistochimique avec l'anticorps AD2. La NDF (C) marquée par l'anticorps AT8. Adapté de Duyckaerts et al. 2009.

7.1.7. Agrégation et facteurs d'agrégation

Tau sous sa forme agrégée est le principal composant des PHF et joue un rôle primordial dans le développement des DNF et la pathogenèse des tauopathies.

Bien que Tau soit une protéine très flexible, soluble et non repliée, elle possède deux motifs hexapeptidiques VQIVKY et VQIINK, situés dans le deuxième et troisième domaine de liaison aux microtubules, dont leur structure en feuillet β leur confèrent un fort potentiel à l'agrégation (Pérez et al., 2002). Ces régions de Tau ont la capacité de s'autoassembler en l'absence de stimuli chimiques supplémentaires (von Bergen et al., 2000; Santa-María et al., 2005) et peuvent également former des agrégats fibrillaires en présence d'acétate d'ammonium (von Bergen et al., 2001).

Un des mécanismes principaux menant à l'agrégation de Tau est la phosphorylation. En effet, l'hyperphosphorylation ou la phosphorylation anormale de Tau entraînent son détachement des microtubules. Une fois détachée, Tau aurait la capacité de s'autoassembler pour former dans un premier temps des dimères, puis s'oligomériser et s'agréger en PHF (von Bergen et al., 2000; Köpke et al., 1993). La déphosphorylation des PHF par les phosphatases PP2A entraîne leur dissociation, restaure la structure de Tau et ses fonctions biologiques telles que l'assemblage et la stabilisation des microtubules (Wang et al., 1995).

L'hyperphosphorylation n'est toutefois pas la seule modification post-traductionnelle impliquée dans l'agrégation de Tau et la troncation, l'ubiquitination, l'oxydation, la glycation, la glycosylation ou la protéolyse participeraient également au processus de fibrogenèse (Guo et al., 2017b). De nombreux autres facteurs, comme l'ApoE ou les polyanions peuvent favoriser et accélérer l'agrégation de Tau (Friedhoff et al., 2000).

La formation des PHF et l'agrégation de Tau sont des processus lents et complexes, et les études *in vitro* tendent à montrer que ces phénomènes font intervenir plusieurs facteurs et modifications post-traductionnelles de Tau.

7.2. Les tauopathies

Les tauopathies regroupent une vingtaine de pathologies neurodégénératives qui ont pour caractéristique commune la présence d'agrégats intracellulaires de la protéine Tau. Parmi les principales tauopathies, on retrouve la maladie d'Alzheimer (MA), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale et la maladie de Niemann Pick (seulement la MA et la PSP seront détaillées dans ce chapitre). Bien que ces maladies soient regroupées sous le terme de tauopathies, elles diffèrent selon leurs signes cliniques et la localisation subcellulaire des agrégats de la protéine Tau et peuvent être classées selon la prédominance des isoformes 3R, 4R, ou un ratio 3R/4R (Kovacs, 2018).

7.2.1. La maladie d'Alzheimer

➤ Généralités

La maladie d'Alzheimer fut décrite pour la première fois par le psychanalyste allemand Aloïs Alzheimer en 1906. Une de ses patientes, Auguste D. âgée de 46 ans, présenta pendant 5 ans des troubles évolutifs caractérisés par des troubles de la mémoire et de l'orientation, des hallucinations auditives, des troubles praxiques et une démence. A son décès, l'autopsie cérébrale révéla la présence de plaques amyloïdes et de neurodégénérescence fibrillaire. Cette démence fut par la suite dénommée maladie d'Alzheimer (MA) en 1910.

La MA est la première cause mondiale de démence, représentant 70 à 80% des démences. Sa prévalence augmente avec l'âge, touchant 5% de la population âgée de plus de 65 ans et jusqu'à 20% au-delà de 85 ans. Cette maladie d'origine sporadique peut également être héréditaire. Cependant, on considère que seulement 1% des patients ont une MA d'origine familiale, et que le plus grand facteur de risque reste l'âge (Buée et al., 2000). Elle se manifeste par un fort déclin cognitif, une perte de la mémoire, des troubles de l'aphasie et de l'apraxie et une altération des fonctions exécutives. Ces troubles sont la conséquence d'une atteinte progressive du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du système limbique et

du cortex (temporal et frontal). Ces atteintes cérébrales sont caractérisées par deux lésions majeures : les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (Delacourte and Buée, 1997; Goedert et al., 1995).

➤ **Lésions neuropathologiques**

Au cours de la MA, on observe une hyper-phosphorylation ainsi qu'une phosphorylation anormale des protéines Tau qui vont induire leur détachement des microtubules (Köpke et al., 1993; Kosik et al., 1988). Les protéines Tau vont former des oligomères, puis s'associer par paire afin de former des filaments appariés en hélice (PHF) toxiques qui vont ensuite s'agréger et donner **les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (figure 19)** (KIDD, 1963). Ces lésions intracellulaires neuronales conduisent à la dégénérescence progressive des neurones.

La deuxième caractéristique lésionnelle est la présence de **plaques amyloïdes** ou plaques séniles. L'A β est un peptide β -amyloïde issu du clivage de la protéine APP (*amyloid precursor protein*) par les enzymes β - et γ -sécrétases. Une augmentation de la production de l'A β ou une diminution de sa dégradation, entraîne son accumulation extracellulaire et induit la formation de dépôts amyloïdes que l'on nomme les plaques amyloïdes (**figure 19**).

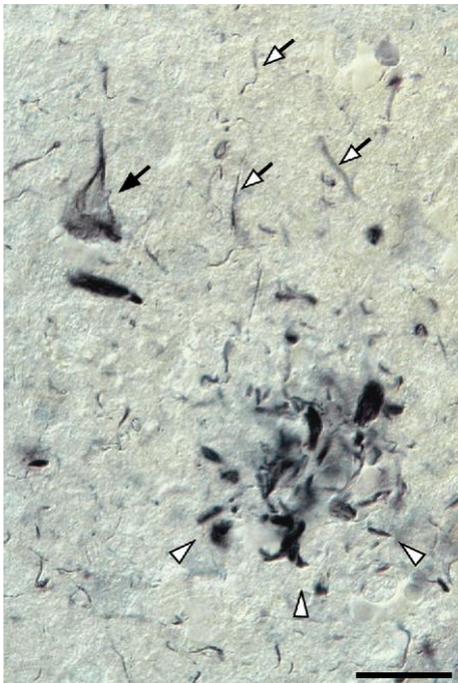


Figure 19 : Pathologie neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer (MA). Marquage immunocytochimique de la triade neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer : Dégénérescence neurofibrillaire (flèche noire), les neuropiles (flèches blanches) et les plaques neuritiques (triangles blancs) (Marquage effectué avec l'anticorps AT8 ; échelle : 50 μ m). D'après Arendt et al., 2016.

➤ Une tauopathie mixte

L'analyse *post mortem* par Western Blot du profil migratoire des protéines Tau présentes dans les PHF de patients atteints de la MA a montré la présence des six isoformes hyperphosphorylées sur leurs résidus Ser396-Ser404 (AD2) et Ser262 ou Ser356 (12E8) (figure 20) (Sergeant et al., 1999). De plus, Sergeant et al. ont observé la phosphorylation anormale des résidus Thr212-Ser214 (AT100) sur les protéines Tau (plus faiblement sur l'isoforme 2N4R). Leur étude met en évidence que la MA appartient aux tauopathies mixtes 3R et 4R.

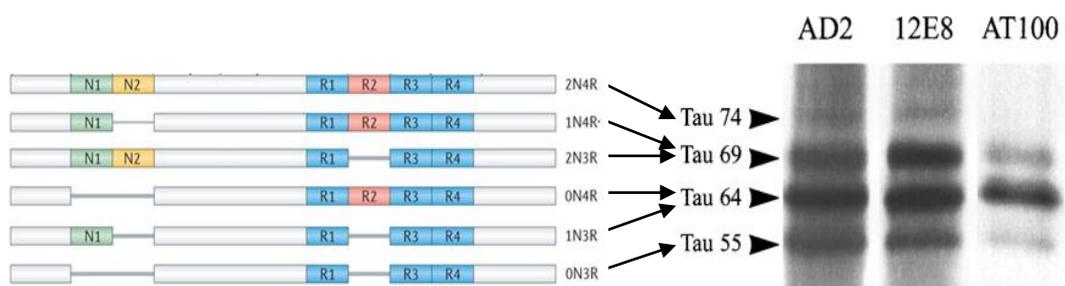


Figure 20 : Figure représentant les différentes isoformes phosphorylées de la protéine Tau présentes dans les PHF de patients atteints de la MA. A droite est représenté le profil migratoire des 6 isoformes hyperphosphorylées sur leur résidu Ser396-Ser404 (AD2) et Ser262 ou Ser356 (12E8) et Thr212-Ser214 (AT100). Adapté de Sergeant et al., 1999 et Wang and Mandelkow, 2016

7.2.2. La paralysie supranucléaire progressive

➤ Généralités

La paralysie supranucléaire progressive (PSP) fut caractérisée en 1964 par les chercheurs Steele, Richardson et Olszewski (STEELE et al., 1964). La PSP est une maladie neurodégénérative rare qui touche 5-6 personnes sur 100 000. Les signes cliniques sont nombreux et incluent des troubles oculomoteurs, un syndrome parkinsonien doparésistant, une dysphagie et des troubles cognitifs et comportementaux. La neuropathologie de la PSP affecte aussi bien les neurones que les cellules gliales (Nishimura et al., 1992). Les caractéristiques lésionnelles de la PSP sont la présence de DNF dans les neurones, des touffes astrocytaires et des corps spiralés dans les oligodendrocytes, tous contenant la protéine Tau hyperphosphorylée sous forme agrégée. Ces lésions se localisent dans les ganglions de la base, le mésencéphale, le noyau dentelé et le cortex.

➤ Une tauopathie 4R

Dans cette même étude, Sergeant et al. ont également caractérisé le profil des isoformes Tau présentes dans les PHF de patients atteints de PSP. Contrairement aux patients MA, on ne retrouve la présence que de deux variants majeurs à 64kDa (ON4R) et 69kDa (1N4R), et d'une forme mineure à 74kDa

(2N4R), phosphorylées sur leur résidus Ser396-Ser404 (AD2) et Ser262 ou Ser356 (12E8) (**figure 21**). Ce profil reflète l'agrégation sélective des isoformes de Tau à quatre domaines de liaison. Leur étude met en évidence un profil différent des isoformes de Tau phosphorylées dans les PHF entre la MA et la PSP, et montre que les PSP sont caractérisées par une tauopathie exclusivement 4R (Sergeant et al., 1999).

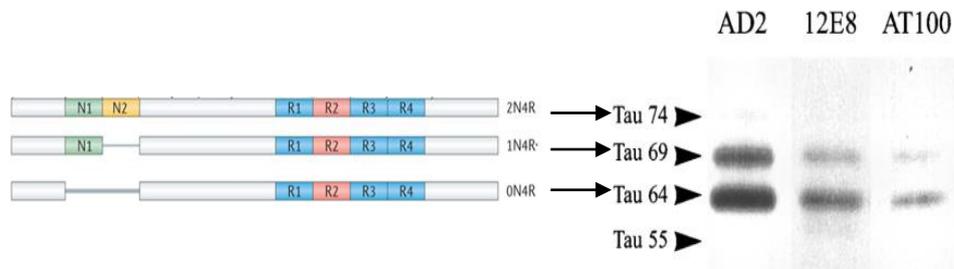


Figure 21 : Figure représentant les isoformes 4R hyperphosphorylées de la protéine Tau présentes dans les PHF de patients atteints de PSP. A droite est représenté le profil migratoire des 3 isoformes 4R hyperphosphorylées sur leur résidus Ser396-Ser404 (AD2) et Ser262 ou Ser356 (12E8) et Thr212-Ser214 (AT100). Adapté de Sergeant et al., 1999 et Wang and Mandelkow, 2016

VIII. L'inflammation et les tauopathies

8.1. La gliose, l'astrogliose et les tauopathies

Tout comme pour les synucléinopathies, l'inflammation centrale joue un rôle important dans la pathogénèse des tauopathies. Comme décrit dans le chapitre II (Neuroinflammation et Synucléinopathies), les principaux acteurs de la neuroinflammation sont la microglie et les astrocytes. L'inflammation est premièrement protectrice pour l'organisme mais une activation prolongée et une réponse excessive de ces deux types cellulaires peuvent causer ou contribuer aux dommages tissulaires et au développement de pathologies (Lyman et al., 2014).

Au cours de la MA, on retrouve la présence de microglies activées et d'astrocytes réactifs à proximité des plaques amyloïdes ainsi que des dépôts A β dans des lymphocytes T (Sastre et al., 2006). De façon concomitante, une colocalisation entre les oligomères de Tau et la microglie activée est observée chez les patients MA (Nilson et al., 2016). Une augmentation de TNF- α et d'IL-6 est observée dans le sérum et le cortex de patients AD comparés aux témoins de même âge (Fillit et al., 1991; Strauss et al., 1992). Des études ont également montré que la prise d'AINS diminuerait le risque de développer une MA, suggérant un rôle central de la neuroinflammation dans l'initiation et le processus pathologique de la MA.

Les autres tauopathies sont également touchées par la neuroinflammation. On observe une activation de la microglie et des astrocytes GFAP réactifs au cours de la maladie de Pick et une microgliose

dans la SN de patients PSP (Fernández-Bostrán et al., 2011; Schofield et al., 2003). Cependant, même si une neuroinflammation est retrouvée dans les tauopathies, les régions cérébrales touchées par la microglie réactive, et l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires diffèrent selon les tauopathies. De façon comparative, une augmentation de l'expression de l'IL-1 β est observée dans la SN de patients PSP comparés aux patients AD et témoins tandis que l'expression de l'IL-1 β et du TGF- β est plus élevée dans le cortex pariétal de patients AD comparés aux PSP et témoins (Fernández-Bostrán et al., 2011).

8.2. La neuroinflammation et tauopathies: cause ou effet ?

La neuroinflammation occupe une part importante dans la pathogenèse des tauopathies mais son rôle, et plus particulièrement le rôle de la microglie, a majoritairement été étudié vis-à-vis des plaques amyloïdes. En effet, la microglie participe à la fois à la dégradation des dépôts amyloïdes et, de par la production de médiateurs pro-inflammatoires, à la progression des Tauopathies (Cai et al., 2014). Cependant les liens de causalité entre les formes pathologiques de Tau et la neuroinflammation restent plus complexes. En effet, de nombreuses études montrent que la neuroinflammation impacte la structure et la phosphorylation de Tau, tandis que d'autres travaux suggèrent que cette inflammation serait un évènement secondaire.

Plusieurs études ont montré qu'une surexpression de Tau et des formes pathologiques de Tau menaient à une activation de la microglie et une réactivité des astrocytes. En effet, les formes mutées de Tau, et plus particulièrement la mutation P301S retrouvée chez les patients atteints de démence fronto-temporale, entraînent une activation de la microglie autour des neurones contenant Tau hyperphosphorylée, une production accrue d'IL-1 β et de Cox-2 (Bellucci et al., 2011) ainsi qu'une perte neuronale précédant la formation des PHF (Yoshiyama et al., 2007). De plus, dans des cultures gliales, l'exposition à la forme tronquée de Tau active la microglie via des voies MAPK et NF κ B dépendantes et induit la production d'IL-1 β , d'IL-6, de TNF- α et de NO (Kovac et al., 2011). Afin de reproduire les inclusions de Tau astrocytaires, marqueurs des PSP et DCB, l'équipe de Trojanowski et al. a généré des souris transgéniques surexprimant Tau sous le contrôle d'un promoteur GFAP. Ils ont observé une accumulation de Tau agrégée, hyperphosphorylée et insoluble dans les astrocytes, une altération de la BHE et une mort neuronale dans les régions touchées par les inclusions, suggérant le rôle délétère d'une astrogliose au cours de Tauopathies (Forman et al., 2005). Le lien entre la réponse immunitaire et les formes pathologiques de Tau est également mis en évidence par une colocalisation entre les oligomères de Tau et la microglie activée dans des modèles murins de Tauopathies (Nilson et al., 2016). De plus, des souris transgéniques immunodéprimées et portant la mutation P301S, présentent une diminution de la pathologie Tau et ont une espérance de vie plus longue, montrant le rôle délétère des réactions inflammatoires dans le processus pathologique des Tauopathies (Yoshiyama et al., 2007).

De façon réciproque, la neuroinflammation impacte également la structure et les fonctions physiologiques de Tau. Dans un modèle murin exprimant la mutation P301L, l'injection intracérébrale de LPS entraîne une microgliose et potentialise l'hyperphosphorylation de Tau sur ses résidus sérine 199/202 et sérine 396 mais n'augmente pas la formation de neurodégénérescence fibrillaire comparée aux souris mutées ayant reçu une injection de solution physiologique (Lee et al., 2010). Une autre étude a montré, dans un modèle de coculture de microglie et neurones, que l'hyperphosphorylation de Tau et les altérations synaptiques induites par le LPS sont médiés par l'IL-1 β et l'activation de la voie p38 (Li et al., 2003). En effet, l'administration de LPS chez des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 β n'induit pas d'hyperphosphorylation de Tau (Bhaskar et al., 2010). Par ailleurs, non seulement l'IL-1 β mais également l'IL-6, le TNF- α et le NO induisent la phosphorylation de Tau intracellulaire (Janelsins et al., 2008; Quintanilla et al., 2004; Saez et al., 2004). De façon intéressante, dans un modèle murin de la MA, le traitement à la minocycline, un anti-inflammatoire, réduit la production de médiateurs inflammatoires et diminue la phosphorylation de Tau (Noble et al., 2009).

Ainsi, toutes ces études mettent en évidence un cercle vicieux entre l'inflammation et les formes pathologiques de Tau. Tau hyperphosphorylée peut être sécrétée et activer la microglie, qui en réponse va libérer des médiateurs pro-inflammatoires qui, en retour, vont augmenter la phosphorylation de Tau (**figure 22**) (Laurent et al., 2018). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de définir si des facteurs environnementaux induisent l'hyperphosphorylation de Tau en premier lieu ou si la microgliose est le premier évènement menant à l'augmentation de phosphorylation au cours des Tauopathies.

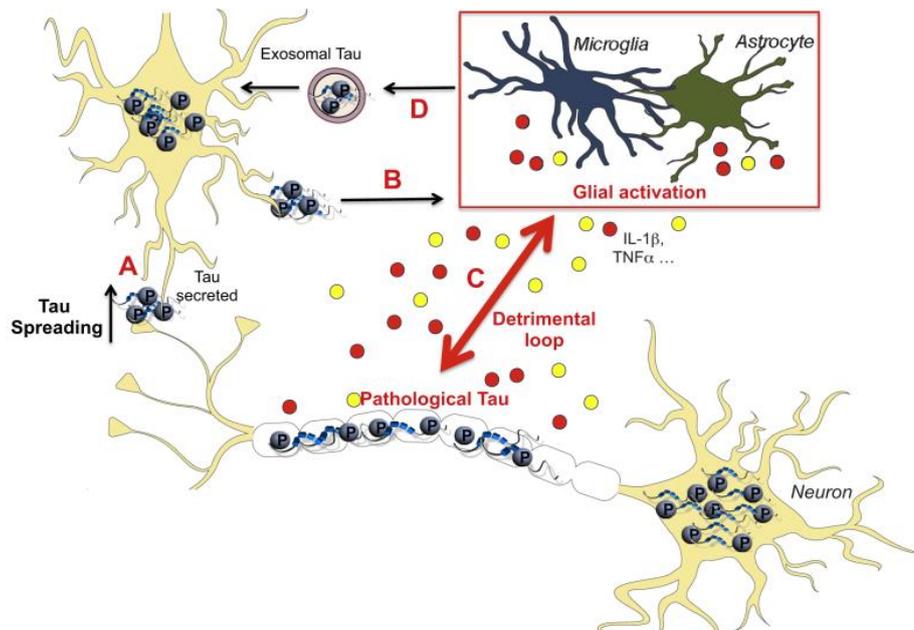


Figure 22 : Réponse immunitaire innée et pathologie Tau : un cercle vicieux. Les espèces Tau pathologiques hyperphosphorylées peuvent être sécrétées, ce qui explique la propagation progressive de la tauopathie (A). Par conséquent, elles favorisent l'activation microgliale / astrocytes réactifs qui libèrent des cytokines ou des molécules inflammatoires neurotoxiques dont IL1 β ou TNF α (B). Par une modulation des kinases de Tau (p38, cdk5...), l'activation gliale augmente la pathologie de Tau, et entretient ce cercle vicieux (C). De plus, la microglie a été observée pour être impliquée dans la propagation de Tau en phagocytant Tau et en la libérant via les exosomes (D). D'après Laurent et al., 2018.

IX. Tau et SNE

L'expression de Tau dans le SNC est maintenant connue et détaillée, cependant, peu d'études se sont intéressées à la distribution de Tau dans différents organes périphériques, et plus particulièrement dans le SNE en conditions physiologiques et au cours de Tauopathies. Toutefois, on retrouve cinq études qui ont examiné l'expression de Tau dans des modèles murins et chez l'humain.

9.1. Données expérimentales chez l'animal

La toute première étude de caractérisation des isoformes Tau dans de multiples organes chez le rat adulte a été réalisée en 1996 par l'équipe de Gu (Gu et al., 2002). Ils ont observé, par PCRq, la présence d'ARNm de Tau dans le cortex, la moelle épinière, la rétine, et en faible quantité dans le cœur, l'estomac, les reins, les poumons, les testicules, et les glandes adrénégiques. En normalisant la quantité d'ARNm retrouvée dans le cortex à 100%, ils retrouvent 1% de Tau dans l'estomac. Grâce à des primers spécifiques, ils ont pu comparer la distribution des isoformes 0N, 1N, 2N, et 3R, 4R entre les différents tissus. Ils retrouvent les trois isoformes 0N, 1N, et 2N dans le cortex (majoritairement 0N et 1N) et dans l'estomac (majoritairement 1N et 2N) (**figure 23**). Les isoformes 4R semblent être majoritaires dans cortex (90%)

tandis que la 3R (70%) serait l'isoforme la plus présente dans l'estomac (environ 30% d'isoformes 4R comparées aux formes totales de Tau). L'isoforme « Big Tau » est également beaucoup exprimée dans l'estomac (à raison de 20% des isoformes totales) (**figure 23**). Ces résultats sont également retrouvés au niveau protéique, avec la présence de Big Tau ainsi que la présence majoritaire des isoformes 3R dans l'estomac, et principalement les isoformes 4R dans le cortex (**figure 23**). Par ailleurs, leurs études de déphosphorylation suggèrent que Tau est partiellement phosphorylée dans ces deux organes en conditions physiologiques.

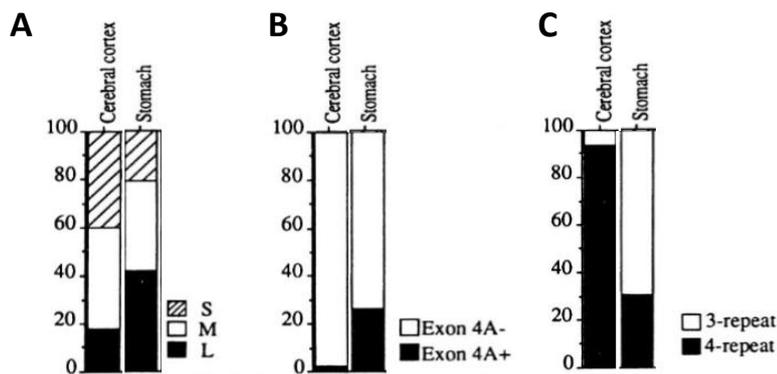


Figure 23 : Différences d'expression des isoformes de Tau entre le cortex et l'estomac. Représentation graphique des PCRq. A : Isoformes N-terminales sans (S) ou avec un insert de 29 résidus (M) ou 58 résidus (L). B : Quantité relative du Big Tau (exon 4A+). C : isoformes C-terminales, isoformes à trois et quatre répétitions. D'après Gu et al., 2002

9.2. Données expérimentales chez l'homme

En 1990, l'équipe de Tam a réalisé la première analyse immunohistochimique de Tau et des MAPs dans le côlon de 6 enfants. Les tissus fixés et coupés en section de 10µm sur lames ont permis d'étudier toutes les couches du SNE. Leurs résultats ont montré que MAP1 n'était pas exprimée dans le SNE et MAP2 était seulement retrouvée dans les plexus sous-muqueux et myentérique. En revanche, MAP5 et Tau semblaient suivre la même expression selon leur localisation et étaient retrouvées de façon abondante dans les fibres musculaires et surtout dans les deux plexus, et en moindre mesure dans la muqueuse et la lamina propria (**tableau 4**) (Tam, 1990). Cette étude a permis de mettre en évidence que Tau était exprimée dans toute la paroi du côlon et que l'expression différentielle des MAPs entre le SNC et le SNE suggère un rôle potentiellement différent et reflète les différences intrinsèques entre les deux systèmes nerveux.

	MAP1	MAP2	MAP5	τ	NSE	S100	NF
Longitudinal muscle	0	0	++	++	++	++	+
Myenteric plexus	0	+	++++	++++	++++	++++	++
Circular muscle	0	0	+++	+++	++++	++++	+
Submucous plexus	0	+	++++	++++	++++	++++	++
Muscularis mucosae	0	0	+	+	++	++	0
Lamina propria	0	0	+	+	++	++	0
Blood vessels	0	0	+	+	++	++	0

NOTE. Semi-quantitative scores used: 0, absent; +, scanty; ++, moderate; +++, abundant; +++++, very abundant.

Tableau 4 : Immunoréactivité des Protéines associées aux microtubules (MAP), de la protéine Tau (τ), Neuron-Specific Enolase (NSE), S100 β et les neurofilaments (NF) dans les côlons humains d'enfants. D'après Tam, 1990.

Trois autres études se sont intéressées à l'expression de Tau chez l'homme adulte, dans les tissus périphériques en conditions physiologiques et dans les Tauopathies. La première étude a examiné l'expression de Tau dans le SNE chez des témoins, et a mis en évidence, par immunohistochimie, la présence de Tau dans les corps cellulaires et les fibres nerveuses des ganglions du plexus myentérique de l'estomac et de l'intestin chez l'homme (Chambonnière et al., 2001), montrant que Tau est également exprimée dans la partie haute du tube digestif. Cependant, ils ont utilisé des anticorps totaux de Tau et n'ont pas fait la distinction entre les différentes isoformes. Dugger et al. ont étudié plusieurs tissus périphériques chez des patients atteints de MA. Par dosage Elisa, ils n'ont pas observé de différences d'expression de Tau dans le côlon de patients MA comparés aux témoins. De plus, leur analyse par western blot montre la présence de deux bandes immunoréactives avec l'anticorps anti-tau total HT7 migrant aux alentours de 50 kDa dans le côlon. Ils n'ont toutefois pas été plus loin dans l'analyse des isoformes de Tau dans le TD. L'immunoreactivité de PHF1 montre un taux basal de phosphorylation de Tau sur les sérines 396-404 dans le côlon, mais aucune différence d'expression n'est observée entre les témoins et les patients AD, suggérant que l'expression de Tau n'est pas modulée au cours dans la MA dans le côlon (Dugger et al., 2016). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les isoformes prédominantes dans le SNE humain adulte, d'étudier l'expression d'autres sites majeurs de phosphorylation (AT8) et de l'agrégation de Tau dans le SNE au cours des tauopathies.

En mars de cette année, après la publication de nos travaux, Dugger et al. ont poursuivi leur étude mais cette fois-ci en analysant l'immunoréactivité de Tau total et de sa phosphorylation sur deux sites majeurs dans le côlon sigmoïde chez des patients atteints de tauopathies dont le diagnostic clinique fut déterminé *post mortem*. Par marquage IHC sur des tissus fixés et à l'aide d'un anticorps total de Tau HT7, ils ont retrouvé la présence de Tau dans les différentes couches du SNE, et plus particulièrement dans le plexus myentérique chez 97% des cas étudiés. L'analyse de la phosphorylation de Tau sur ces résidus T213 et S202-205 (AT8), ne semble pas être modulée au cours de la MA, PSP et DCB comparés aux témoins, suggérant que l'atteinte pathologique au cours des tauopathies est restreinte au SNC et ne s'étend pas au système nerveux périphérique. Cependant, en moyennant tous les patients inclus, ils retrouvent 54%

et 8% d'immunoréactivité pour les anticorps pT231 et AT8, respectivement, suggérant une faible phosphorylation basale de Tau sur ces résidus S202-T205 dans le côlon (**tableau 5**) (Dugger et al., 2019). Une des limitations de cette étude est l'absence de quantification de l'expression de la protéine Tau dans les différentes tauopathies et l'absence d'analyse de formes agrégées. Des études supplémentaires seront nécessaires pour statuer sur une possible neuropathie entérique au cours des tauopathies.

Sigmoid Colon	NC	PSP	AD/PSP	CBD	AD	AD/CBD
# HT7 positive cases/total (%)	16/18 (89%)	13/13 (100%)	8/8 (100%)	2/2 (100%)	19/19 (100%)	1/1 (100%)
anatomic location of staining, number of cases						
Mucosa	6	6	4	1	6	0
Submucosa	13	10	7	2	14	1
Muscularis (fibers)	9	10	5	2	9	1
Myenteric plexus	15	13	8	2	19	1
# T231 positive cases/total (%)	8/18 (44%)	9/13 (69%)	5/8 (63%)	1/1 (100%)	9/18 (50%)	0/1 (0%)
anatomic area of staining, number of cases						
Mucosa	0	0	0	0	0	0
Submucosa	2	5	2	0	4	0
Muscularis (fibers)	2	4	3	0	5	0
Myenteric plexus	8	9	5	1	9	0
# AT8 positive cases/total (%)	2/18 (11%)	2/14 (14%)	0/8 (0%)	0/1 (0%)	1/20 (5%)	0/1 (0%)
anatomic area of staining, number of cases						
Mucosa	0	0	0	0	0	0
Submucosa	1	1	0	0	1	0
Muscularis (fibers)	1	1	0	0	1	0
Myenteric plexus	2	2	0	0	1	0

Tableau 5 : Fréquence de l'immunoréactivité de Tau dans le colon sigmoïde au cours des différentes tauopathies majeures. La fréquence de l'immunoréactivité est basée sur le nombre de cas immunoréactifs / nombre total de cas évalués. D'après Dugger et al., 2019

I. Hypothèse et objectifs n°2

Dans la deuxième partie de thèse, nous nous sommes intéressés à une deuxième protéine neuronale, la protéine Tau, qui est une protéine intracellulaire majoritairement exprimée dans les axones des neurones et dont les fonctions principales sont de polymériser et stabiliser les microtubules. Six isoformes différentes de Tau sont exprimées dans le SNC humain adulte par épissage alternatif (0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R et 2N4R). Son état de phosphorylation affecte fortement ses fonctions, en diminuant sa capacité à interagir avec les microtubules et diverses protéines de signalisation. En conditions pathologiques, des inclusions de Tau agrégée et anormalement hyperphosphorylée sont observées dans de nombreuses maladies neurodégénératives, regroupées sous le nom tauopathies, dont les principales sont la MA, la PSP, la DCB et la maladie de Pick. Ces dernières peuvent toutes être classées en fonction de la prédominance des isoformes Tau 3R et 4R retrouvées dans les dégénérescences neurofibrillaires. La neuroinflammation joue un rôle important dans le développement et le processus pathologique des tauopathies, en impactant la phosphorylation, la structure et les fonctions physiologiques de Tau.

L'étroite homologie entre le SNC et le SNE suggère qu'un processus pathologique affectant le SNC pourrait également impliquer le SNE. Quelques études ont montré que Tau est exprimée dans le TD des rongeurs et de l'homme, mais peu de données sont disponibles sur le niveau d'expression et de phosphorylation des isoformes de Tau ainsi que sur sa régulation en conditions pathologiques dans le SNE. En effet, la seule étude examinant ce point est celle de Drugger et al. 2019, et n'était pas encore publiée au moment où nous soumettions notre article. L'objectif était donc de voir si le concept de synucléinopathie entérique, retrouvée dans la MP, pouvait être étendu aux tauopathies.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient, dans un premier temps, d'étudier le niveau d'expression et de phosphorylation des isoformes de Tau *in vitro* dans des cultures primaires de SNE et SNC de rat, et *in vivo* dans des biopsies coliques humaines, ainsi qu'en conditions pathologiques dans des biopsies coliques de patients atteints de la MP et de la PSP. Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle de l'inflammation chronique intestinale sur la régulation de Tau entérique, dans des biopsies coliques de patients atteints de MICI.

II. Résultats n°2

ARTICLE 1 :

Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy

RESEARCH

Open Access



Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy

Arthur Lionnet^{1,2,3}, Matthew A. Wade⁴, Anne-Gaëlle Corbillé^{1,2,3}, Alice Prigent^{1,3}, Sébastien Paillusson⁴, Maddalena Tasselli⁴, Jacques Gonzales^{1,3}, Emilie Durieu¹, Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,3}, Emmanuel Coron^{1,3}, Emilie Duchalais^{1,3}, Michel Neunlist^{1,3}, Michael S. Perkinson⁵, Diane P. Hanger⁴, Wendy Noble^{4*}  and Pascal Derkinderen^{1,2,3*}

Abstract

Tau is normally a highly soluble phosphoprotein found predominantly in neurons. Six different isoforms of tau are expressed in the adult human CNS. Under pathological conditions, phosphorylated tau aggregates are a defining feature of neurodegenerative disorders called tauopathies. Recent findings have suggested a potential role of the gut-brain axis in CNS homeostasis, and therefore we set out to examine the isoform profile and phosphorylation state of tau in the enteric nervous system (ENS) under physiological conditions and in tauopathies. Surgical specimens of human colon from controls, Parkinson's disease (PD) and progressive supranuclear palsy (PSP) patients were analyzed by Western Blot and immunohistochemistry using a panel of anti-tau antibodies. We found that adult human ENS primarily expresses two tau isoforms, localized in the cell bodies and neuronal processes. We did not observe any difference in the enteric tau isoform profile and phosphorylation state between PSP, PD and control subjects. The htau mouse model of tauopathy also expressed two main isoforms of human tau in the ENS, and there were no apparent differences in ENS tau localization or phosphorylation between wild-type and htau mice. Tau in both human and mouse ENS was found to be phosphorylated but poorly susceptible to dephosphorylation with lambda phosphatase. To investigate ENS tau phosphorylation further, primary cultures from rat enteric neurons, which express four isoforms of tau, were pharmacologically manipulated to show that ENS tau phosphorylation state can be regulated, at least in vitro. Our study is the first to characterize tau in the rodent and human ENS. As a whole, our findings provide a basis to unravel the functions of tau in the ENS and to further investigate the possibility of pathological changes in enteric neuropathies and tauopathies.

Keywords: Tau, Tau isoform, Tau phosphorylation, Enteric nervous system, Progressive supranuclear palsy, Parkinson's disease, Gut, Biopsy, Htau mouse

* Correspondence: Wendy.Noble@kcl.ac.uk; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr; derkinderen@yahoo.fr

Arthur Lionnet, Matthew A. Wade, Anne-Gaëlle Corbillé and Alice Prigent contributed equally to this work.

Wendy Noble and Pascal Derkinderen Co-senior authorship

⁴King's College London, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, Department of Basic and Clinical Neuroscience, Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, Rm 1.23, 5 Cutcombe Road, Camberwell, London SE5 9RX, UK

¹Inserm, U1235, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes, France

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



© The Author(s). 2018 **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.

Introduction

The microtubule-associated protein tau is found predominantly in neurons, where it exists as a highly soluble protein that interacts with the cytoskeleton [25, 28]. Six different isoforms of tau are expressed in the adult human CNS via alternative splicing of the *MAPT* gene, which comprises 16 exons. Regulated inclusion of exons 2 and 3 yields tau isoforms with 0, 1, or 2 N-terminal inserts (0 N, 1 N, 2 N, respectively), whereas exclusion or inclusion of exon 10 leads to expression of tau isoforms with three (3R) or four (4R) microtubule-binding repeats [28]. The various splice combinations of tau are thus abbreviated 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R, encoding six protein isoforms ranging from 352 to 441 amino acids in length [25]. The function of tau is strongly affected by its phosphorylation status, which influences its ability to interact with microtubules and various signaling proteins [20, 57], as well as its localization and association with membranes [56, 63]. Under pathological conditions, aberrant assembly of highly phosphorylated tau into insoluble aggregates is observed in a range of neurodegenerative disorders, collectively referred to as tauopathies. Tauopathies encompass more than 20 clinicopathological entities, including Alzheimer's disease (AD), progressive supranuclear palsy (PSP), Pick's disease, all of which can be biochemically subclassified according to the predominance of tau isoforms found in the intracellular aggregates [43]. Tau aggregates found in tauopathies generally contain tau in an elevated state of phosphorylation [7, 29, 34] that is often aberrantly cleaved [31, 51]. Highly phosphorylated forms of tau are also found in other neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease (PD), where it often colocalises with abnormal alpha-synuclein [39, 66].

The enteric nervous system (ENS) is an integrated neuronal network distributed from the lower esophagus to the rectum. Compared to other components of the peripheral nervous system, the ENS shows some unique features that closely resemble the CNS and is sometimes referred to as 'the brain-in-the-gut' or the 'second brain'. This close homology between the CNS and ENS suggests that a disease process affecting the CNS could also involve its enteric counterpart, as has already been described in variant Creutzfeldt-Jakob disease [33, 41] and PD [6, 21, 65]. Whether such a scenario can be extended to other neurodegenerative disorders such as tauopathies remains to be demonstrated, and this was one focus of the current study.

A few studies have shown that tau is expressed in rodent [30] and human [8, 17, 61] gastrointestinal (GI) tract, but no data are available about the distribution and phosphorylation pattern of tau isoforms in the ENS. Here, we examined the expression levels of tau isoforms, their phosphorylation profile and truncation in sigmoid colon biopsy specimens from PSP patients and compared them to samples from PD patients and controls. We examined

the same tau characteristics in a mouse model of tauopathy in comparison to wild-type mice. Our results show the expression of two main human tau isoforms in the ENS. ENS tau is phosphorylated but is remarkably resistant to dephosphorylation with lambda phosphatase. We then examined the isoform profile and phosphorylation state of tau under physiological conditions in rat primary enteric neuron cultures, which showed that ENS tau phosphorylation can be modified, at least in vitro. These data provide the first detailed characterization of ENS tau in humans and rodents in health and tauopathies. Further investigation of tau modifications in the ENS in disease may provide valuable information about tau modifications that promote or prevent tau abnormalities spreading between the gut and brain in neurodegenerative diseases.

Material and methods

Human tissues

Samples of frozen temporal cortex from one post-mortem human brain devoid of neurodegeneration were obtained from the Neuropathology Department of Angers (Dr Franck Letournel) to serve as a control for the following experiments. Specimens of human colon were obtained from three neurologically unimpaired subjects who underwent colon resection for colorectal cancer. For all three tissues specimens, sampling was performed in macroscopically normal segments of uninvolved resection margins. Colonic sections were separated into muscle and submucosal/mucosal layer [36], which contain the myenteric and submucosal plexus respectively. Two out of three samples were frozen and kept at -80°C until further analysis by Western blot. The remaining sample was analyzed by immunohistochemistry.

Routine sigmoid colon biopsies were obtained during sigmoidoscopy/colonoscopy from 24 subjects, 10 with PD, 5 with PSP and 9 controls. All patients were recruited from the movement disorder clinic at Nantes University Hospital, France. Diagnosis of PD was made according to criteria provided by the United Kingdom Parkinson's Disease Survey Brain Bank. PSP patients fulfilled the diagnostic criteria for possible or probable PSP. Control subjects were healthy subjects who had a routine colonoscopy performed for colorectal cancer screening. All controls subjects underwent a detailed neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. Except for control subjects 183 and 208 (Table 1) who had 6 biopsies, 4 biopsies per patient were taken during the endoscopic procedure. Biopsies were stored at -80°C until required.

The sampling of human brain and colon 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 Humans and registered under the no. DC-2008-402. Regarding sigmoid biopsies sampling,

Table 1 Demographics and characteristics of controls subjects and patients

Patient #	Age/sex	Diagnosis	DD
183	49/F	Control	–
188	67/F	Control	–
189	63/F	Control	–
190	45/M	Control	–
191	19/F	Control	–
208	76/M	Control	–
210	63/F	Control	–
214	69/F	Control	–
227	56/F	Control	–
162	56/F	PD	12
166	64/F	PD	11
167	67/M	PD	10
168	55/F	PD	4
171	71/M	PD	3
173	67/M	PD	11
175	70/M	PD	12
177	70/F	PD	8
178	53/F	PD	1
179	52/F	PD	4
170	63/F	PSP	4
176	72/M	PSP	4
185	72/F	PSP	11
187	75/M	PSP	5
228	76/F	PSP	1

Patient ID, age, sex, diagnosis of PD or PSP (including probable PSP) are shown in addition to disease duration (DD) in years

the study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest VI*), and registered on ClinicalTrials.gov (Enterolark and ColoBioParker, identifier NCT01618383 and NCT01353183, respectively). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Mouse tissues

Htau mice (B6.Cg-Mapt^{tm1(EGFP)Klt}Tg(MAPT)8cPdav/J) were originally purchased from the Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and maintained at King's College London. Wild-type and tau knockout offspring of an identical background strain (C57Bl/6 J) were obtained via breeding. All housing and experimental procedures were carried out in compliance with the local ethical review panel of King's College London under a UK Home Office project license held in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and the European Directive 2010/63/EU. Two-month old male and female mice

were used in this study. Animals were housed at 19–22 °C, humidity 55%, 12 h:12 h light: dark cycle with lights on at 07:30. Animals were culled using Schedule 1 methods, brains removed and snap-frozen on dry-ice. Sections of colon tissue were removed, with tissue from the distal portion of each part being cleaned and snap-frozen on dry-ice, prior to storage at – 80 °C for RNA extraction or biochemical analysis. The proximal portion from each part of colon along with the duodenum, jejunum and ileum were dissected with fine forceps to reveal the myenteric plexus as described previously [62].

Rat tissues

Sciatic nerve sections were taken from two pregnant Sprague-Dawley rats (used for the generation of primary culture of rat ENS, see below) to serve as a positive control for big tau experiments [60].

Primary cultures of rat ENS

Primary culture of rat ENS were generated using pregnant Sprague-Dawley rats (Janvier Laboratories SA, Le Genest-St-Isle, France) as previously described [11]. All housing and experimental procedures were carried out in compliance with the local ethical review panel of INSERM (agreement E. 44,011; INSERM, Nantes, France). Pregnant rats were killed by an overdose of CO₂ followed by severing the carotid arteries. The small intestines of rat embryos were removed, diced in Hank's Buffered Salt Solution (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and collected in 5 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (Gibco®, Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) (1:1) for digestion at 37 °C for 15 min in 0.1% (v/v) trypsin (Sigma). The trypsin reaction was stopped by adding medium containing 10% fetal calf serum and then treatment with DNase I 0.01% (v/v) (Sigma) for 10 min at 37 °C. After triturating with a 10 mL pipette, cells were centrifuged at 750 rpm for 10 min. Cells were counted and then seeded at a density of 2.4 × 10⁵ cells/cm² on 24-well plates previously coated with a solution of 0.5% (v/v) gelatin in sterile phosphate buffered saline. After 24 h, the medium was replaced with a serum-free medium DMEM-F12 (1:1) containing 1% (v/v) of N-2 supplement (Life Technologies). Cultures were maintained for 14 days.

Treatment of rat ENS primary cultures with serine/threonine phosphatases inhibitors

After 14 days in vitro (DIV), cells were treated with a cocktail of three phosphatase inhibitors including 1 μM okadaic acid, 1 μM ciclosporine A and 6.75 μM sanguinarine (Sigma) for broad-spectrum inhibition of serine/threonine phosphatases, or with vehicle (DMSO, Sigma) for one hour.

Dephosphorylation of tissues and cell lysates

For dephosphorylation experiments, cells or tissues were homogenised in a buffer containing 100 mM NaCl and 50 mM Tris-Cl at pH 7.4 with 1% (v/v) IGEPAL® CA-630 and a protease inhibitors cocktail without EDTA (Roche, Neuilly sur Seine, France) using either a “Precellys 24” (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) or a Tissue Master 125 (Omni International, Kennesaw, GA, USA) tissue homogenizer and followed by sonication with “vibracell 75 186” device (Sonics, Newton CT, USA). Homogenates were centrifuged at 16,300 g for 20 min at 4 °C with an Eppendorf 5415R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany), sonicated for 10 s and protein amounts normalized following a BCA protein assay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Samples were diluted to 1.0 mg/mL protein using homogenisation buffer and incubated with 20 U/μL lambda phosphatase in MnCl₂ and enzyme buffer as supplied with the lambda protein phosphatase kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for 3 h at 30 °C. The reaction was stopped by the addition of sample buffer (National Diagnostics, Hull, UK or Life Technologies, Courtaboeuf, France) and heating to 95 °C for 5 min. Control samples were treated identically without the addition of lambda phosphatase.

SDS-PAGE and western blot

For dephosphorylation experiments, cells or tissues were processed as described above. For experiments that did not require dephosphorylation, cells or tissues were lysed in RIPA lysis buffer (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France). Western blots were performed as we previously described [10] using NuPAGE™ 10% Bis-Tris Protein Gels (Life Technologies, Courtaboeuf, France). The primary anti-tau antibodies used are listed in Table 2.

Phospho-ERK (Cell signaling, Ozyme, France 1:2000 dilution) and PGP 9.5 antibodies (Abcam, France, 1:1000 dilution) were used for the evaluation of phosphatase treatment and as loading control, respectively.

Immunohistochemistry

For mouse GI tract tissues, following the excision of myenteric plexus from mouse colon, tissue segments were incubated in combined blocking (50 mM tris-buffered saline [TBS] pH 7.4 containing 5% bovine serum albumen [BSA] and 0.05% tween-20) and permeabilisation (50 mM TBS pH 7.4, 0.1% triton X-100) solutions overnight at 4 °C. Primary antibodies (Table 2) in blocking solution were incubated with gut tissues overnight at 4 °C. Following washing in 50 mM TBS the appropriate fluorescently-tagged secondary antibody was added for 3 h at ambient temperature, the antibodies removed by washing and Hoechst 33258 added for 3 min. Images were acquired using a CTR5000 digital camera (Leica Microsystems, Cambridge, UK) attached to a Leica DM5000B fluorescence microscope with Leica AIF lite software.

For human tissues, fixed human tissues were embedded in paraffin using an embedding station (LEICA EG1150C) and sections (3 μm) were cut using a microtome (LEICA RM2255). The sections were deparaffinised by bathing twice in xylene (for 5 min each) and taken through graded concentrations of ethanol (100, 95, 70, 70%, respectively for 3 min each). After a rinse in distilled water, slides were washed in PBS and antigen retrieval was performed using a sodium citrate solution (2.94 g Sodium Citrate Tribase; 1 L ultrapure water; 500 μL Tween 20; pH 6) at 95 °C for 20 min. Slides were incubated in NH₄Cl (100 mM) for 15 min before incubation in PBS-0.5% triton X-100 for 1 h and blocking for

Table 2 Tau antibodies used in this study

Name	Specificity	Epitope (a.a)	Source and dilution
A0024 Tau	All tau isoforms	243–441 (2N4R)	Dako, rp (WB 1:1000; IHC 1:500)
TAU-5	All tau isoforms	210–241 (2N4R)	ThermoFisher, mm (WB 1:1000)
Tau-1	All tau isoforms	189–207 (2N4R)	Merck, mm, clone PC1C6 (WB 1:2000)
TP70	All tau isoforms	428–441 (2N4R)	IOP, KCL, rp (WB 1:500)
Anti tau RD3	3R tau Isoforms	267–282 (2N3R)	Merck, mm, clone 8E6 (WB 1:1000; IHC 1:500)
Anti tau RD4	4R tau isoforms	275–291 (2N4R)	Merck, mm, clone 1E1/A6 (WB 1:1000)
Anti 4R-tau	4R tau isoforms	NS	Cosmo bio co., rp (WB 1:2000; IHC 1:1000)
Anti 0 N-tau	0 N Tau isoforms	39–50 (0N3R)	BioLegend, mm (WB 1:500)
AT8	Tau @ S202/T205	Tau @ S202/T205	Innogenetics, mm (WB 1:1000)
PHF-1	Tau @ S396/S404	Tau @ S396/S404	Gift from Peter Davies, mm (WB 1:500)
PHF13	Tau @ S396	Tau @ S396	Cell Signaling, mm (WB 1:1000)
CP13	Tau @ S202	Tau @ S202	Gift from Peter Davies, mm (IHC 1:200)

The name, specificity, epitope, source and dilution of the antibodies used in this study are shown.

Abbreviations: a.a. amino-acids, IHC immunohistochemistry, IOP, KCL Institute of Psychiatry, King's college London, mm mouse monoclonal, NS not specified, rp rabbit polyclonal, WB western blot

2 h in 10% horse serum in PBS-0.5% triton X-100. Primary antibodies (Table 2) were incubated overnight at 4 °C, and following washing, secondary antibodies were added for 2 h at room temperature. Images were acquired with an Olympus IX 50 fluorescence microscope coupled to a digital camera (model DP71, Olympus).

RNA extraction and RT-PCR

Frozen proximal colon and cortex from htau, wild-type and tau knockout mice was homogenised in approximately 100 mg/mL RNeasy lysis buffer supplied with the RNeasy RNA LipidEasy kit (Qiagen, Hilden, Germany), and RNA was extracted following the manufacturer's protocol. The RNA obtained was eluted in ultrapure H₂O and its concentration and purity determined using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were diluted to 1 µg RNA/15 µL RNase-free H₂O, heat-shocked for 3 min at 72 °C to break down double-stranded structures and returned immediately to ice. One µg RNA per sample was reverse transcribed using a Superscript III reverse transcriptase assay kit (Life Technologies, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was stored at -20 °C until use. To examine the alternate splicing of the microtubule binding domain repeat region encoded by exon 10, primers were used that specifically recognize mouse or human exons 9 and 11 as described by Duff et al. [16]. Primer sequences were: mouse exon 9F 5'-CCCCCTAAGTCACCATCAGCTAGT, mouse exon 11R 5'-CACTTTGCTCAGGTCCACCGGC, human exon 9F 5'-CTCCAAAATCAGGGGATCGC, human exon 11R 5'-CCTTGCTCAGGTCAACTGGT. Splicing around the N terminal insert domain encoded by exons 2 and 3 was detected using primers that recognize exons 1 and 5. Primer sequences used were: mouse exon 1F 5'-TCCGCTGTCCTCTTCTGTC, mouse exon 5R 5'-TTCTCGTCATTTCTGTCC, human exon 1F 5'-TGAACCAAGATGGCTGAGC, human exon 5R 5'-TTGTCATCGCTTCCAGTCC. Annealing temperatures were 64 °C (all *MAPT* primers), 62 °C (M1F/M5R) and 68 °C (M9F/M11R). 35 reaction cycles were used for all. Mouse and human-specific RT-PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis. Products corresponding to exon 10+ tau mRNA (4R) are 390 base pairs (bp), while products corresponding to exon 10- mRNA (3R) are 297 bp. RT-PCR products containing tau mRNA with exons 2 and 3 (2 N) are 428 bp, 2+3- mRNA products (1 N) are 341 bp, and 2-3- mRNA products (0 N) are 253 bp.

Statistics

All data shown are mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using GraphPad software version 5.00 (San Diego California, USA). For comparisons of means between

groups, Kruskal-Wallis tests were performed. Differences were deemed statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The expression pattern of tau isoforms is different in adult human brain and gut

In adult human brain, the six tau isoforms are phosphorylated resulting in reduced electrophoretic mobility on SDS-PAGE compared to recombinant tau [25]. In order to identify the tau isoforms expressed in the human ENS, colonic samples from healthy subjects treated or not with lambda phosphatase [35] were analyzed by western blot using the A0024 tau antibody that recognizes all six tau isoforms. ENS samples were compared to dephosphorylated and non-dephosphorylated brain samples as well as to a recombinant tau ladder. The banding pattern was markedly different between brain and colonic samples (Fig. 1a). The A0024 Tau antibody detected one major band migrating at 53–54 kDa in both the submucosal and muscle layers (which contain the submucosal and myenteric plexus, respectively and therefore are referred to as SMP and MP) (Fig. 1a). This band migrated only slightly faster after dephosphorylation of SMP and MP samples despite the efficiency of the dephosphorylation treatment being validated by phospho-ERK immunoblot, Fig. 1a). The major band detected in ENS samples comigrated with 0N4R-1N3R detected in human brain samples and the recombinant tau ladder (red line in Fig. 1a) and was also observed when a pan-tau (TAU-5) antibody was used (Fig. 1b). In addition, a fainter band around 57–58 kDa in SMP and a strong immunoreactive band at 62 kDa (white arrow) in both SMP and MP were also observed when the A0024 tau antibody was used (Fig. 1a). These two bands are most likely non-specific as they were not observed with TAU-5 (Fig. 1b) or with other specific antibodies subsequently used in this study (Figs. 1b, c and 2).

To further refine this analysis, we used 3 commercially available isoform-specific tau antibodies. Two of these antibodies directed against 3R and 0 N-tau have been shown to be highly specific in a recent comprehensive study that tested the specificity of tau antibodies using immunoblotting [19]. In addition, we used a 4R-tau antibody that only detects 4R tau isoforms in human brain lysates and in tau ladder (Additional file 1: Figure S1). All of these antibodies detected a single 53–54 kDa-band that comigrates with the major band detected by TAU-5 and with 0N4R-1N3R in the recombinant tau ladder (Fig. 1b).

Until recently, analysis of the ENS in humans was mainly performed using full thickness specimens of the gut obtained during surgery or autopsy. However, several recent studies have shown that the ENS is accessible and analyzable through routine GI biopsies, which can be processed to measure quantitative differences in neuronal

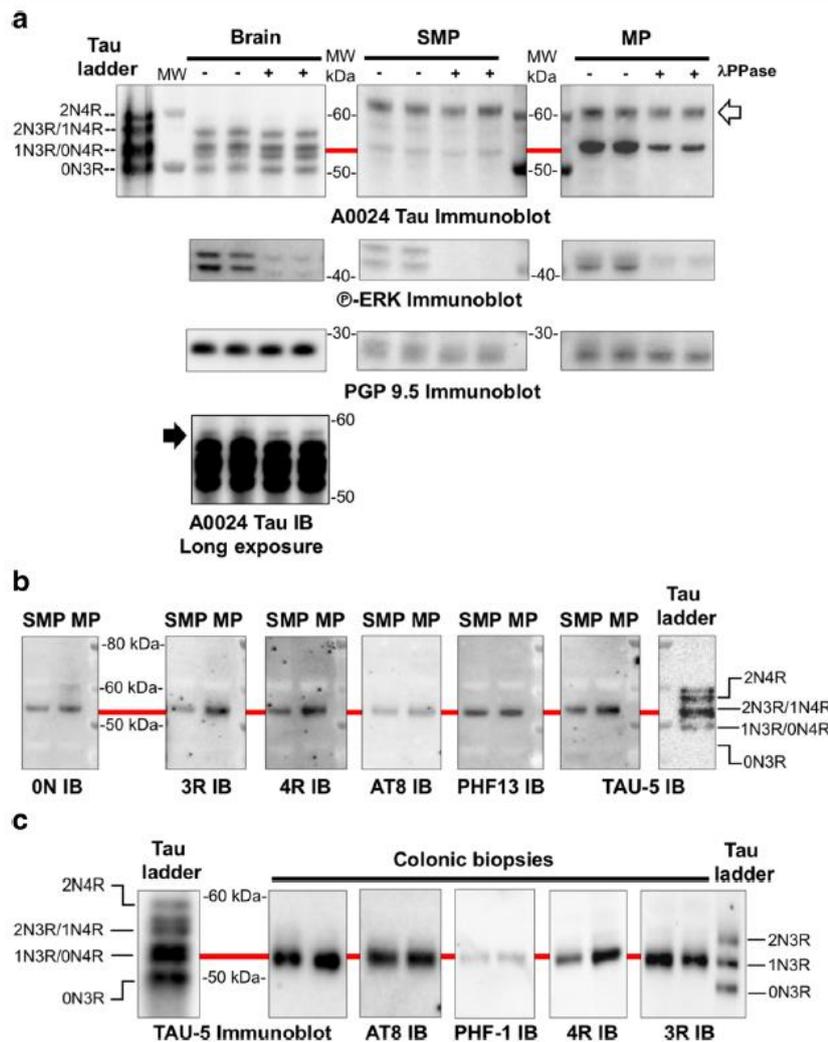


Fig. 1 Tau isoforms and phosphorylation in adult human ENS. **a** Human brain and colon tissue lysates (submucosal and muscle layers, which contains the submucosal (SMP) and myenteric plexus (MP), respectively) were subjected to immunoblot analysis using the pan-Tau antibody A0024. Lysates were treated (+) or not (-) with lambda phosphatase before immunoblotting. The effectiveness of dephosphorylation was confirmed by phospho-ERK immunoblot (P-ERK immunoblot). Tau antibody A0024 detected all six tau isoforms in the recombinant human tau ladder and brain samples (the 2N4R was only visible on long exposure immunoblots, black arrow). The non-specific band detected by Tau antibody A0024 in the ENS is marked by a white arrow. An antibody against protein gene product (PGP) 9.5 was used as a loading control. **b** Colon tissue lysates (SMP and MP) were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific to 0 N, 3R, 4R tau, the pan-tau TAU-5 antibody, and the phospho-specific tau antibodies AT8 (phos-Ser202/Thr205) and PHF13 (phos-Ser396). **c** Sigmoid colon biopsies lysates from 2 control subjects (#183 and 208, Table 2) were subjected to immunoblot analysis using the TAU-5 antibody, antibodies specific to the 3R and 4R tau isoforms and the phospho-specific tau antibodies AT8 and PHF-1. In all experiments, the banding pattern was compared to that of tau ladder which contains all six recombinant tau isoforms. The red line shows the comigration of the observed bands with 1 N3/0N4R. The results shown in (a), (b) and (c) are representative of 3, 2 and 5 independent experiments, respectively

and/or glial markers [5, 23, 44]. We therefore analyzed the expression levels of tau in routine sigmoid biopsies from 2 control subjects (#183 and 208, Table 1) with the pan-tau antibody TAU-5 and with the 3R and 4R isoform-specific antibodies. The immunoblotting pattern observed with

these 3 antibodies in biopsies was similar to those observed in colonic SMP and MP samples (Fig. 1c).

“Big” or peripheral tau is a tau isoform specifically expressed in the peripheral nervous system, including trigeminal, dorsal root and sympathetic ganglia as well as

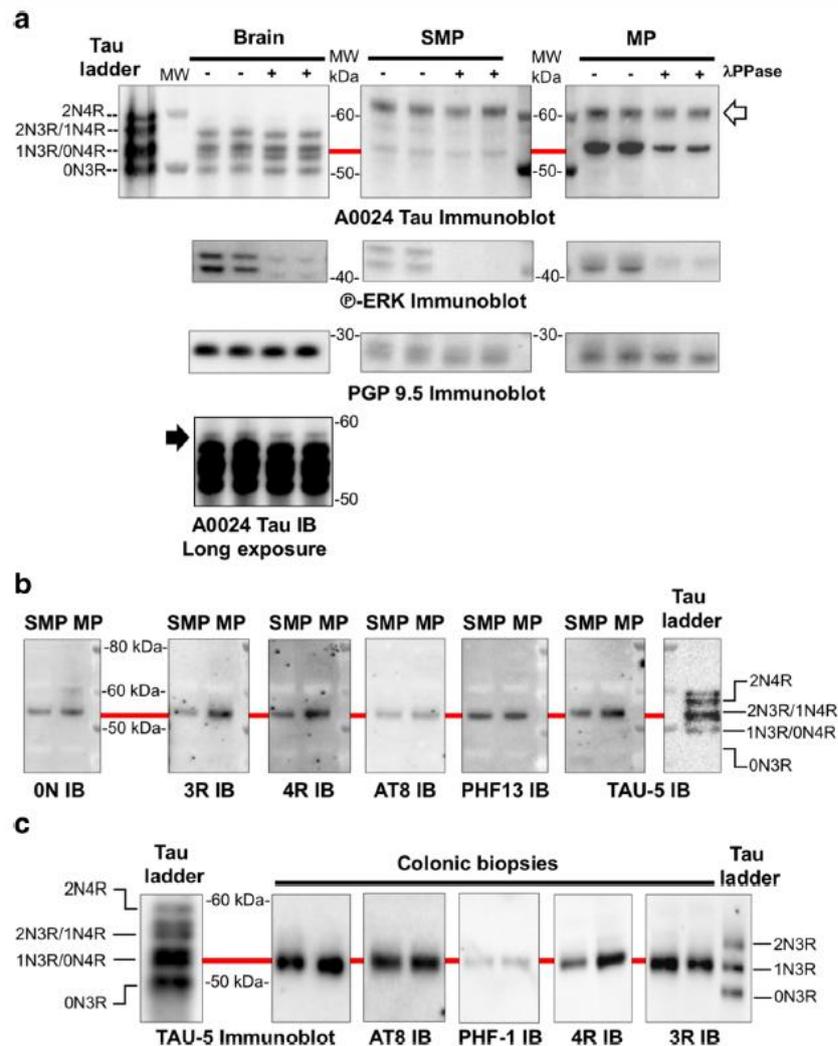
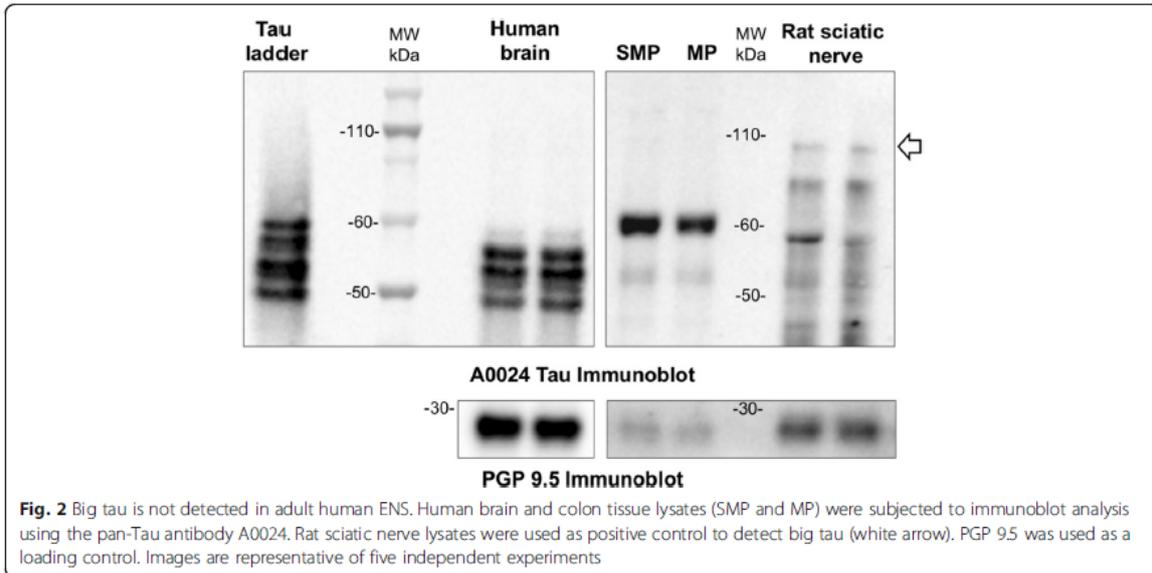


Fig. 1 Tau isoforms and phosphorylation in adult human ENS. **a** Human brain and colon tissue lysates (submucosal and muscle layers, which contains the submucosal (SMP) and myenteric plexus (MP), respectively) were subjected to immunoblot analysis using the pan-Tau antibody A0024. Lysates were treated (+) or not (–) with lambda phosphatase before immunoblotting. The effectiveness of dephosphorylation was confirmed by phospho-ERK immunoblot (P-ERK immunoblot). Tau antibody A0024 detected all six tau isoforms in the recombinant human tau ladder and brain samples (the 2N4R was only visible on long exposure immunoblots, black arrow). The non-specific band detected by Tau antibody A0024 in the ENS is marked by a white arrow. An antibody against protein gene product (PGP) 9.5 was used as a loading control. **b** Colon tissue lysates (SMP and MP) were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific to 0 N, 3R, 4R tau, the pan-tau TAU-5 antibody, and the phospho-specific tau antibodies AT8 (phos-Ser202/Thr205) and PHF13 (phos-Ser396). **c** Sigmoid colon biopsies lysates from 2 control subjects (#183 and 208, Table 2) were subjected to immunoblot analysis using the TAU-5 antibody, antibodies specific to the 3R and 4R tau isoforms and the phospho-specific tau antibodies AT8 and PHF-1. In all experiments, the banding pattern was compared to that of tau ladder which contains all six recombinant tau isoforms. The red line shows the comigration of the observed bands with 1 N3/0N4R. The results shown in **(a)**, **(b)** and **(c)** are representative of 3, 2 and 5 independent experiments, respectively

and/or glial markers [5, 23, 44]. We therefore analyzed the expression levels of tau in routine sigmoid biopsies from 2 control subjects (#183 and 208, Table 1) with the pan-tau antibody TAU-5 and with the 3R and 4R isoform-specific antibodies. The immunoblotting pattern observed with

these 3 antibodies in biopsies was similar to those observed in colonic SMP and MP samples (Fig. 1c).

“Big” or peripheral tau is a tau isoform specifically expressed in the peripheral nervous system, including trigeminal, dorsal root and sympathetic ganglia as well as



sciatic nerve. It differs from the 2N4R tau isoform by a 254 amino-acid insert located in the amino-terminal half and migrates at 110 kDa on SDS/PAGE [27]. To determine whether big tau is expressed in the ENS, human colon tissue lysates were analyzed by Western blot using Tau A0024 antibody. Rat sciatic nerve lysates were used as positive controls [60]. Tau A0024 detected the expected low molecular weight tau isoforms between 45 and 60 kDa in human colon and rat sciatic nerve, however a 110 kDa migrating band was only observed with rat sciatic nerve lysates (Fig. 2).

When taken together, these results show that 1N3R and 0N4R are the two main tau isoforms that are expressed in human adult colon and these two isoforms can be detected in routine GI biopsies. In addition, our work indicates that big tau is not expressed in the adult human ENS.

Tau isoforms are differentially expressed in the gut and brain of tauopathy mice

To determine if tau is also differentially expressed in the ENS and CNS of mice, we used the transgenic htau mouse model which expresses exclusively the six wild-type human isoforms of tau under the control of the *MAPT* promoter [3]. The enteric expression profile of tau isoforms in these transgenic mice was compared to that observed in wild-type mice. Tau knockout mice were examined as an additional control. To this end, RNA from 2-month-old, wild-type, tau knockout and htau mouse proximal colon was reverse transcribed to cDNA and amplified with PCR. Brain tissue from the same mice was used for comparison. Primers were designed, based on those previously described by Duff et al. [16], to detect

splicing of human tau exons 2 and 3. This allowed amplification of products corresponding to 0 N, 1 N and 2 N human tau that were detected in htau, but not wild-type or tau knockout, brain and proximal colon (Fig. 3). Transcripts of 3R and 4R *MAPT* were also observed in htau brain and proximal colon when inclusion of exon 10 was assessed using primers specific to human tau exons 9 and 11 (Fig. 3). Thus, 0 N, 1 N, 2 N, 3R and 4R human tau transcripts are expressed in htau proximal colon.

Primers against mouse tau were also used to allow detection of 0 N, 1 N and 2 N transcripts in wild-type mouse brain and proximal colon (Fig. 3a). A weak non-specific PCR product corresponding to the predicted size of 0 N tau was also amplified in htau and tau knockout samples with these primers. In addition, 4R, but not 3R *Mapt* was detected in WT mouse brain, and a weak signal was also apparent in proximal colon (Fig. 3a). These transcripts were not amplified in htau or tau knockout tissues. Thus, wild-type mice express 0 N, 1 N, 2 N and mainly 4R tau in gut and brain.

The detection of multiple products in a single lane, each corresponding to a different tau isoform, allows each product to act as an internal control for the other transcripts. This allowed us to make comparisons between the relative abundance of tau isoforms in different tissues. Htau brain showed 0 N > 1 N > 2 N relative abundance of tau isoforms, in keeping with previous observations in adult mice [59]. Htau mouse brain also showed greater exclusion of tau exon 10 (3R > 4R), as previously reported [3] and in contrast to adult wild-type mice where mainly 4R tau is expressed (Fig. 3; [59]). Thus, htau brain mirrors human brain in that both 3R and 4R tau are expressed,

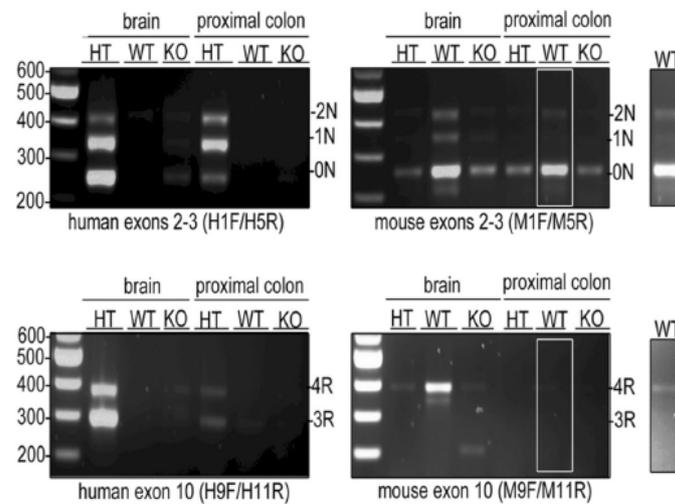


Fig. 3 Detection of tau in htai and wild-type mouse brain and proximal colon. Htau (HT), wild-type (WT) and tau knock-out (KO) brain and proximal colon cDNA was amplified using PCR with human- and mouse-tau specific primers to detect the expression of exon 2–3- (0 N), 2 + 3- (1 N), 2 + 3+ (2 N), 10- (3R) and 10+ (4R) tau isoforms. Gel images show detection of human and mouse 0 N, 1 N and 2 N tau. An insert shows a higher intensity portion of image to illustrate tau products in proximal colon. Numbers correspond to base pairs of a DNA ladder. The expected position of PCR product is indicated to the right of each panel. $N = 3$

albeit that under physiological conditions these isoforms are expressed in approximately equal proportions in the human CNS [4]. In contrast, in htai proximal colon, PCR transcripts showed an altered relative abundance of $1 N > 2 N > 0 N$ (Fig. 3), and there appeared to be approximately equal inclusion and exclusion of exon 10 ($3R \approx 4R$). These data suggest differential expression of tau isoforms in the ENS of htai mice in comparison to those in brain.

Tau protein is expressed throughout the human and mouse myenteric plexus

Immunohistochemistry was used to examine the localization of tau proteins in the human and rodent ENS. Human colonic myenteric plexus showed intense tau immunoreactivity in both neuronal cell bodies and processes when pan-tau A0024, 3R and 4R antibodies were used, which nearly completely overlapped with beta-tubulin immunostaining (Fig. 4a).

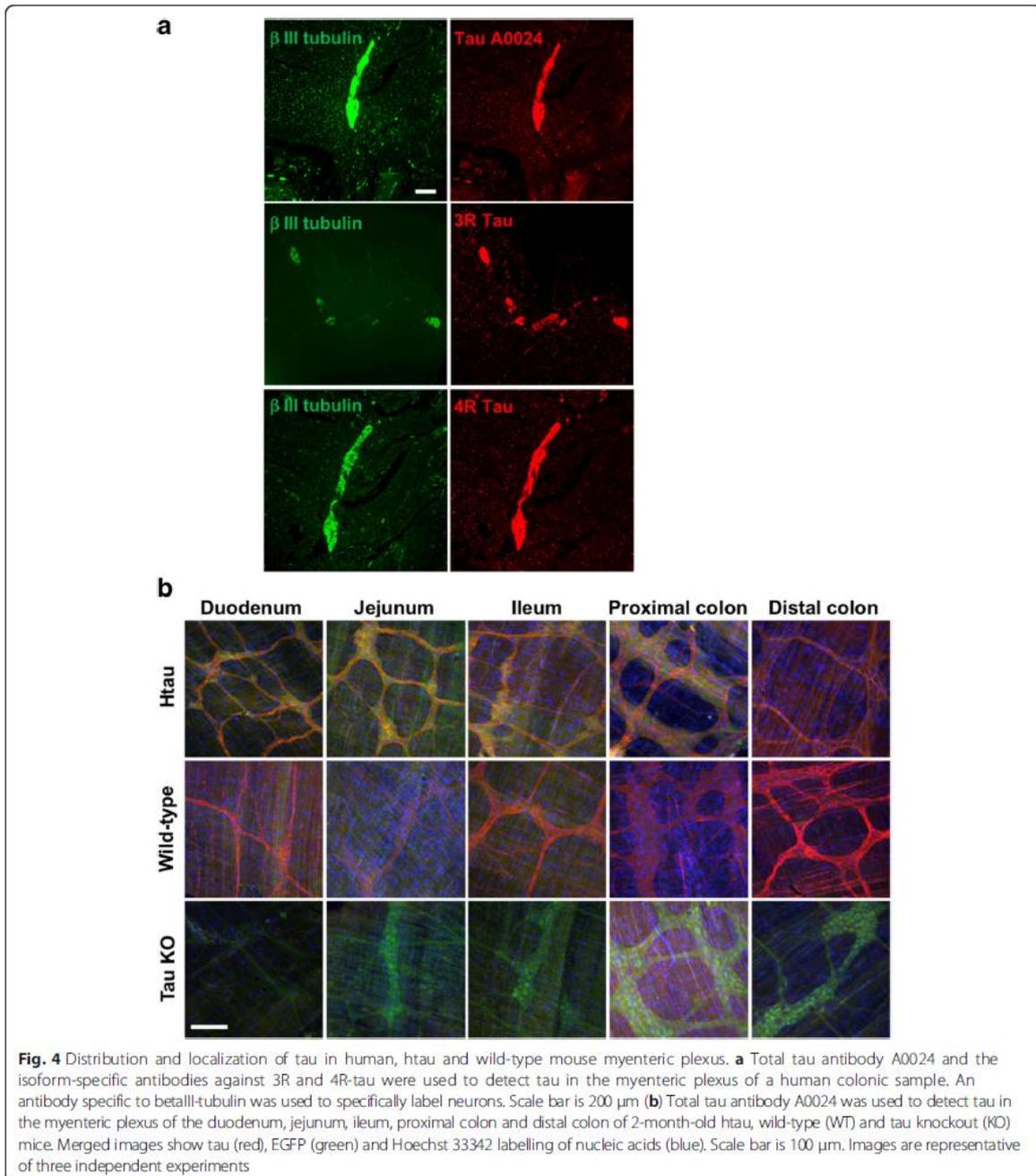
In order to examine the localization of tau proteins in the ENS of htai and wild-type mice, sections of small intestine (duodenum, jejunum, ileum) and large intestine (proximal colon and distal colon) were dissected from 2-month-old htai, wild-type and tau knockout mice to isolate the myenteric plexus. Tissue was immunolabelled with an antibody against total tau (A0024). eGFP fluorescence was also imaged as it is inserted in tau exon 1 to disrupt tau expression in tau knockout and htai mice [3]. Tau proteins were found to be abundant throughout the GI tract of htai and wild-type mice, including in the duodenum, jejunum, ileum, proximal colon and distal

colon (Fig. 4b). There were no apparent differences in neuronal tau localisation between these regions. Htau proximal colon exhibited dense ganglia and axons and a robust tau signal, whereas the axons and ganglia in htai ileum and WT jejunum were less dense and the resulting tau signal was comparatively less intense. Tau KO express GFP which is observed, and show no tau immunoreactivity. Thus, tau protein is expressed in the myenteric plexus throughout the GI tract of wild-type and htai mice.

Tau isoforms are phosphorylated in mature ENS but are not susceptible to dephosphorylation with lambda phosphatase

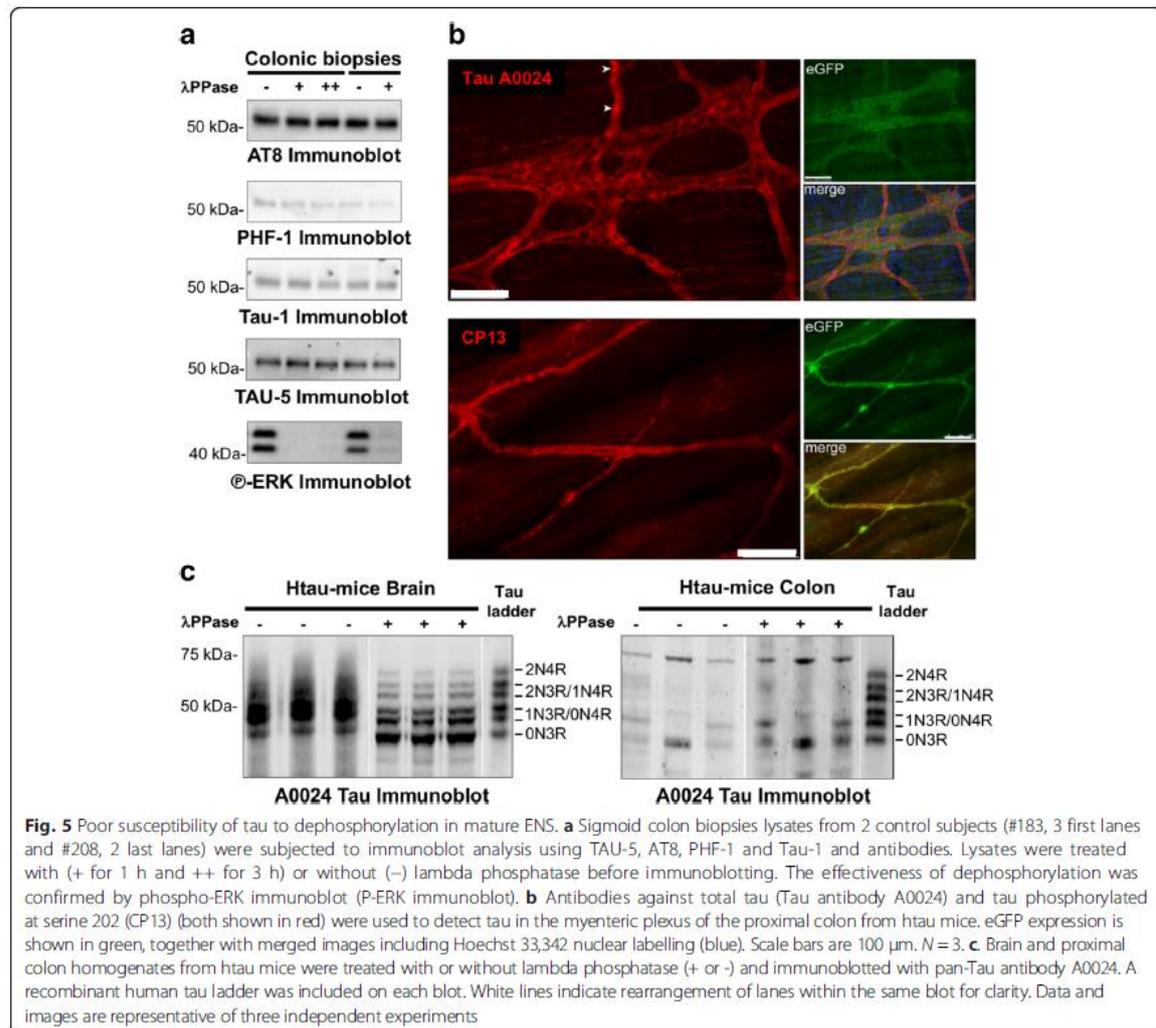
The phosphorylation of tau at multiple serine and threonine sites has been described in both developing and adult brain and is the predominant mechanism by which tau functions are regulated [32]. This logically led us to analyze tau phosphorylation in mature human ENS. Two antibodies specific for tau phosphorylated at Ser202/Thr205 (AT8) [26] and Ser396 (PHF13) [19] detected one single band at 53–54 kDa in colon surgical specimen and biopsies (Fig. 1b and c), thereby demonstrating that the enteric 1N3R and 0N4R tau isoforms are phosphorylated on serine residues under physiological conditions.

We were nevertheless struck by the fact that, in contrast to the brain, lambda phosphatase treatment did not appear to influence the charge/mobility of tau bands in human colon samples when the pan-Tau antibody A0024 was used (Fig. 1a). To further investigate if tau can be dephosphorylated in adult human ENS, colonic biopsy



lysates were treated with lambda phosphatase and western blots of these samples were probed with the phospho tau-specific antibodies AT8 (phospho-Ser202/Thr205), PHF1 (phospho-Ser396/404) and Tau-1 (dephospho-Ser199/202/Thr205). Antibodies against ERK were used to check the efficiency of treatment. Although lambda phosphatase efficiently dephosphorylated ERK, it did not

modify the phosphorylation state of tau, suggesting that tau is relatively resistant to dephosphorylation in the human adult ENS (Fig. 5a). To further examine tau phosphorylation in mature ENS, we analyzed enteric tau phosphorylation and dephosphorylation in htai mice. Tau is phosphorylated in htai mouse ENS, as phospho-Ser202-positive tau was detected in their



colonic myenteric plexus (Fig. 5b). Samples of brain and proximal colon from 2-month-old htai mice were immunoblotted with the pan-Tau antibody A0024. Htau brain showed prominent tau bands ranging from 45 to 70 kDa, in agreement with previous reports [3, 52]. Treatment of these samples with lambda phosphatase to dephosphorylate tau showed that all six major isoforms of tau are expressed in htai brain; these showed good alignment with a recombinant human tau ladder (Fig. 5c). Multiple tau immunoreactive bands ranging from approximately 25–70 kDa were detected in samples from htai proximal colon (Fig. 5c). Two doublets of bands at approximately 45–50 kDa and 55–60 kDa were apparent, which likely corresponds to full-length tau with 0 or 1 N terminal inserts, likely the 1N3R and 0N4R isoforms. Moreover, and in contrast to results with htai brain

samples, lambda phosphatase treatment did not appear to influence the charge/mobility of tau bands in proximal colon samples (Fig. 5c).

Tau expression levels are unaltered in the ENS in PSP

An increase of the 4R tau to 3R tau isoform ratio has been described in some brain regions in PSP [38]. We thus analyzed the expression levels of tau and the relative abundance of 3R and 4R isoforms in the ENS in colonic biopsies from 5 PSP patients in comparison to colonic samples from 10 PD patients and 9 controls devoid of neurodegenerative disorders. Clinical features of the study population are shown in Table 1. The expression levels of total tau as assessed by immunoblots using the Tau-5 antibody, and the 3R/4R ratio was found

not to differ between PSP samples and those from PD and controls (Fig. 6a).

Tau phosphorylation and truncation in the ENS are similar in PSP, PD and control subjects

Abnormal phosphorylation of tau is a characteristic feature of PSP brain [24, 49] and we therefore analyzed the phosphorylation state of tau in colonic biopsies from PSP patients using the AT8 and PHF-1 antibodies. There were no apparent alterations in tau phosphorylation at these sites in PSP samples in comparison to those from PD and controls, or between PD and controls (Fig. 6b).

Besides abnormal phosphorylation, tau is also truncated in the pathological deposits observed in tauopathies, and especially in PSP [31, 51]. C-terminal tau truncation by caspase-3 was evaluated using a Tau Asp421 antibody, which is specific for tau cleaved at Asp421, along with an antibody against the extreme C-terminus of tau (TP70) [59]. Quantification of the immunoreactive bands detected by Tau Asp421 and TP70 showed no difference in tau truncation at Asp421 and the presence of an intact C-terminus, between PD, PSP and control subjects (Fig. 6c).

Four tau isoforms are expressed and phosphorylated in primary culture of rat ENS

Primary neuronal cultures of rat CNS neurons, which primarily express the shortest tau isoforms 0N3R and 0N4R, have been widely used for studying tau expression, aggregation and secretion [13, 52, 56]. The brain is not the only source from which neurons can be cultured and there are now established protocols for the isolation of enteric neurons from rodents and especially rats. These have already been shown to be useful for studying the expression of neuronal proteins involved in neurodegeneration such as alpha-synuclein [54], however the expression pattern of tau isoforms in rat primary ENS culture remains to be determined. As a first approach to identify tau isoforms in cultured rat enteric neurons, we compared the banding pattern on western blots of total tau as evaluated with the A0024 pan-Tau antibody between primary culture of ENS and cortical neurons. In keeping with previous observations [13, 52], this antibody detected a tau doublet with one major band at 50 kDa and a fainter one around 53 kDa in CNS neurons, which likely correspond to 0N3R and 0N4R isoforms, respectively (Fig. 7a). In ENS neurons, the observed banding pattern was markedly different with a triplet of 50, 53 and 58 kDa bands observed, the latter showing the most intense labeling (Fig. 7a). Further blotting with the 3R and 4R specific antibodies identified 0N3R, 1N3R/0N4R and 2N3R as the main component of the tau triplet observed in primary culture of ENS, while 0N3R and 0N4R were the two primary tau isoforms expressed by primary culture of CNS (Fig. 7a).

Phosphorylation of tau at multiple serine and threonine sites can be modulated in primary culture of CNS [13]. To determine whether tau phosphorylation can be also regulated in primary culture of rat ENS, we treated the cells with either lambda phosphatase or a combination of serine/threonine phosphatase inhibitors. Treatment with lambda phosphatase caused tau dephosphorylation, as evidenced by a significant downward shift in mobility of the tau triplet detected with either the pan-Tau A0024 or 3R antibodies (Fig. 7b). Conversely, treatment with phosphatase inhibitors induced tau phosphorylation as shown by upward shift in mobility of the protein on Western blots probed with the pan-Tau A0024 antibody, and the disappearance of all immunoreactive bands when the Tau-1 antibody against dephosphorylated tau was used (Fig. 7c). When the AT8 antibody was used, no signal was observed under basal conditions, while 3 immunoreactive bands were detected in the presence of phosphatase inhibitors (Fig. 7c). The PHF-1 antibody also detected three immunoreactive bands in untreated cells. An increase in signal intensity along with a mobility shift of all 3 bands was observed following treatment of primary ENS cultures with phosphatase inhibitors (Fig. 7c). Thus, the phosphorylation of ENS tau can be modified, at least in an *in vitro* setting.

3R and 4R tau are differentially expressed in rat primary enteric neuron cultures

Lastly, the distribution of tau in rat enteric neurons in culture was examined by immunohistochemistry using pan-Tau A0024, 3R and 4R-tau antibodies at 14 days *in vitro*. Total tau immunoreactivity was observed in both soma and neuronal processes and the staining patterns produced by pan-Tau A0024, 3R-tau and beta III tubulin antibodies were virtually superimposable (Fig. 8). The 4R-tau staining pattern was markedly different from that observed with 3R-tau and was primarily limited to the cell bodies (Fig. 8). These data indicate that 3R and 4R tau species have different localization in rat primary ENS neurons.

Discussion

Here, we have used samples of brain and gut from humans, htau transgenic mice and rat primary cultures to show that the isoform profile of tau differs between the ENS and the CNS. We identified 1N3R and 0N4R as the two main tau isoforms expressed in adult human ENS and observed an apparent difference in the relative abundance of different tau isoforms in htau gut and brain, with 1 N and 2 N tau isoforms being over-represented at mRNA levels in htau gut tissues, although 0 N and 1 N isoforms were the predominant protein species detected. We also found that primary culture of rat ENS express four isoforms of tau contrasting with the predominant

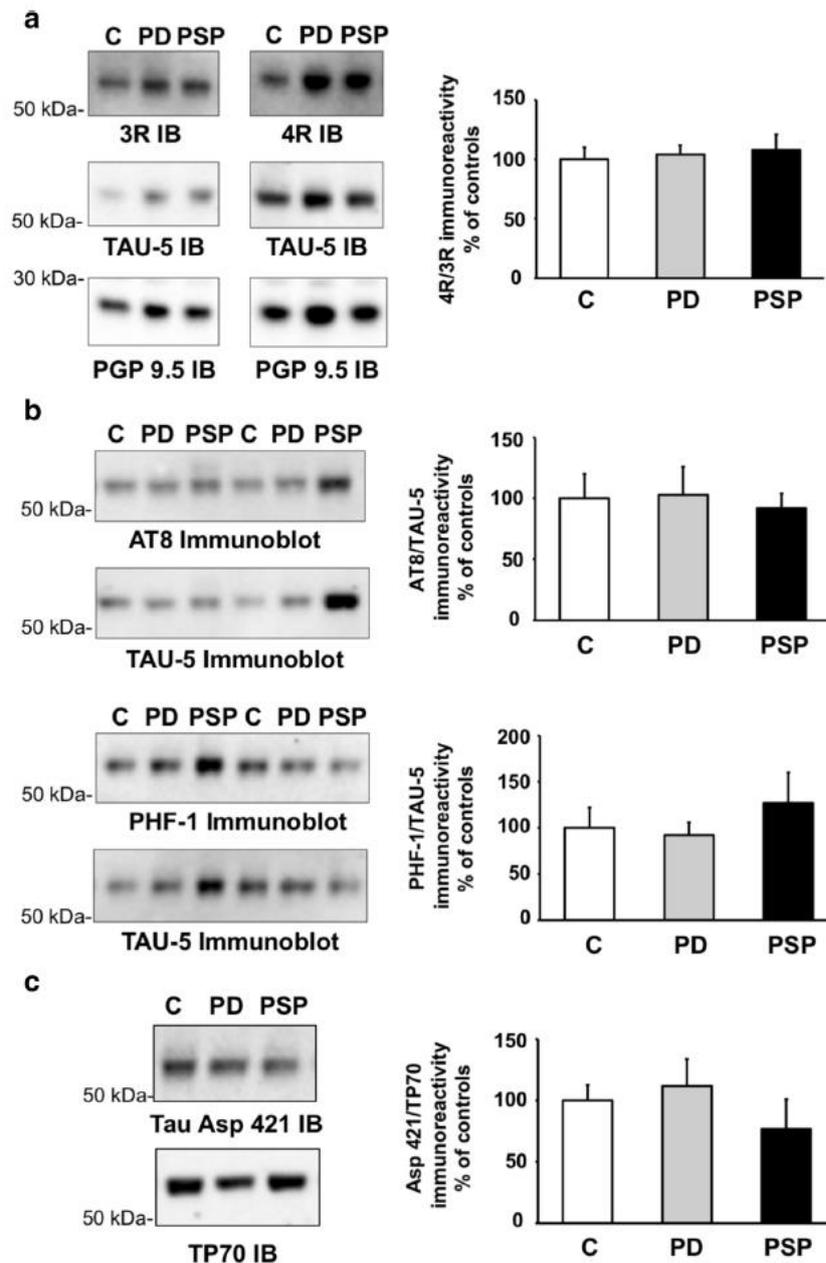
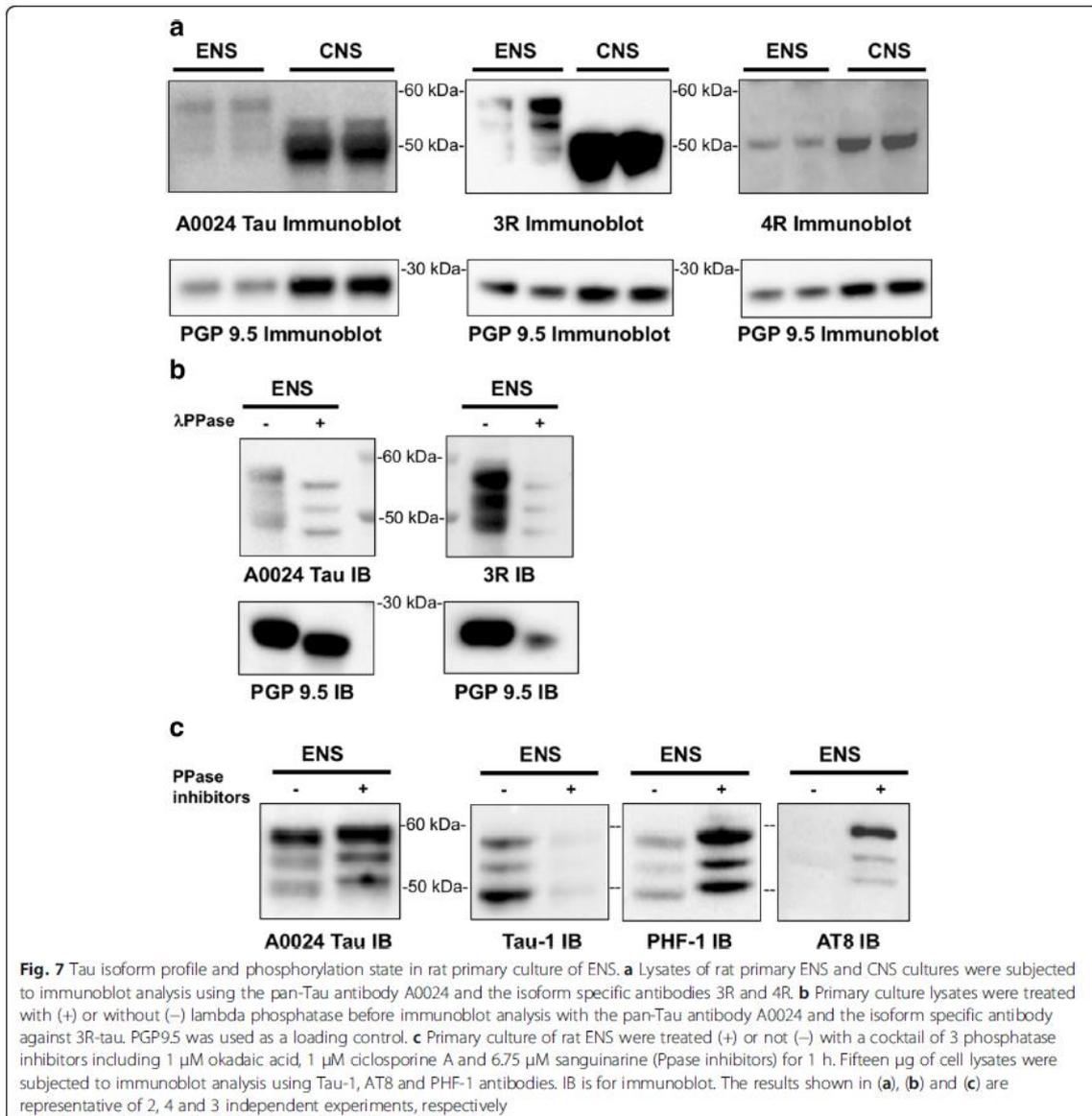


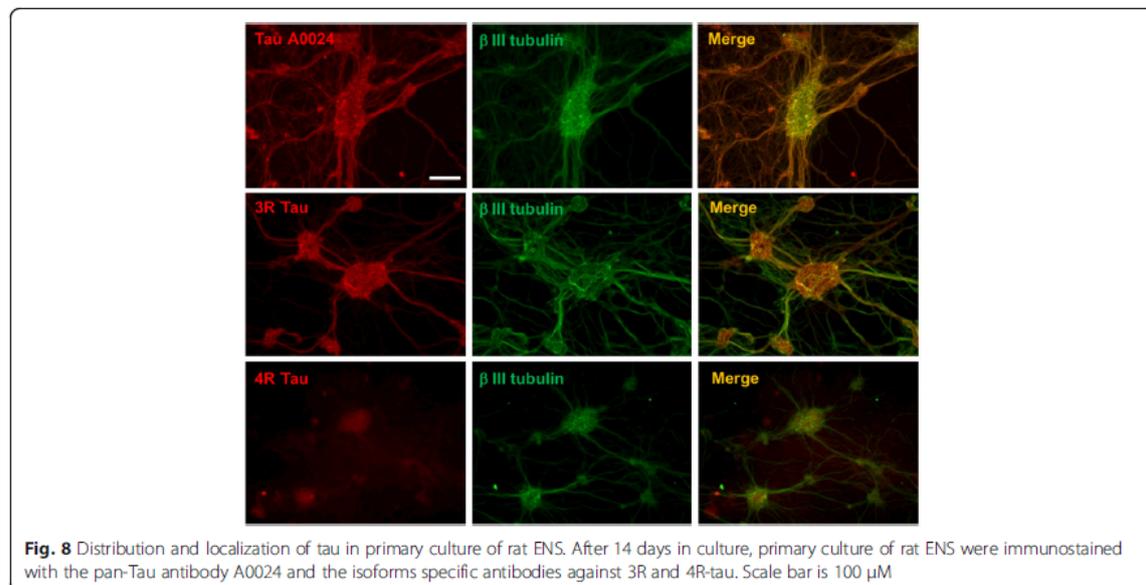
Fig. 6 Tau expression and post-translational modifications in colonic biopsies from patients progressive supranuclear palsy, Parkinson's disease and control subjects. **a** Biopsies lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies against total tau (TAU-5) and against 3R and 4R isoforms. An antibody against protein gene product (PGP) 9.5 was used as a loading control. For quantification, the optical densities of tau-immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5 immunoreactive bands in the same samples and expressed as percentages of controls. **b** Biopsies lysates were subjected to immunoblot analysis using AT8, PHF-1 and TAU-5 antibodies. The optical densities of phospho-tau-immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of TAU-5 immunoreactive bands in the same samples, expressed as percentages of controls. **c** Biopsies lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies Tau Asp421 and TP70. The optical densities of immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of TP70 immunoreactive bands in the same samples, expressed as percentages of controls. Data correspond to mean \pm SEM for 9 control samples (C), 10 from Parkinson's disease (PD) patients and 5 from progressive supranuclear palsy (PSP). Immunoblot (IB)



expression of the single fetal tau ON3R isoform in rat primary cortical neurons. The ENS and the CNS both contain integrated nervous networks and the similarities between them, including between neurons and glia at a morphological level, have led to the ENS being described as the 'brain in the gut' or the 'second brain' [22]. Our current and previous results suggest that this anatomical resemblance does not extend to the molecular level as the ENS expresses only a limited number of isoforms of neuronal and glial markers as compared to the brain [10],

although the functional consequences of these differences still remain to be determined.

Tau was found to be expressed in both the myenteric and submucosal plexus of human colon and throughout the ENS of wild-type mice and in the htau mouse model. In both the human and rodent ENS, tau protein had a mainly axonal and somatic distribution, which might be expected since in physiological conditions, tau is described as being a predominantly axonal protein [32]. The presence of nuclear tau has been documented in a wide variety



of cell and animal systems, including human and rodent brains and neuronal cell lines (reviewed in [32]). So far, the transcript encoding nuclear tau has not been formally identified but findings obtained in mouse brain suggest that the 1N4R isoform is preferentially localised in the nucleus [46]. Although our immunofluorescence experiments performed in mature human and mouse ENS, as well as in primary culture of rat ENS, clearly showed that tau was mainly axonal and somatic, we cannot rule out that a small proportion of enteric tau could also be nuclear. Further experiments including high resolution imaging and biochemical subcellular fractionation will be needed to answer this question.

A panel of well-characterised phospho-specific tau antibodies were used to show that tau is phosphorylated in the ENS of healthy subjects at Ser202/Thr205 and Ser396/Ser404. Tau is known to be phosphorylated at these sites under physiological conditions, with elevated phosphorylation at these epitopes characteristic of pathological conditions in the CNS (reviewed in [53]). There is mounting evidence to suggest that tau phosphorylation plays a key role in neuronal physiology. The function of tau is strongly affected by its phosphorylation status, influencing its ability to interact with signaling proteins and kinases [57], its association with microtubules and membranes and its ability to regulate axonal transport [58]. Phosphorylation of Ser202/Thr205 and Ser396/Ser404 is commonly found in primary cortical neurons under basal conditions [2] as well as in snap-frozen brain biopsies from subject devoid of neurodegenerative conditions [47], suggesting that these sites are involved in the normal physiology of the CNS. This is further reinforced by the recent

observation showing the presence of endogenous tau phosphorylated at these sites at postsynaptic sites in hippocampal neurons where tau interacts with the PSD95-NMDA receptor complex to regulate synaptic activity [48]. These results obtained in the CNS could be extended to the ENS where neuronal plasticity has also been described following modulation of neuronal activity [9, 37].

Soluble tau from adult human brain consist of a heterogeneous mixture of tau isoforms in multiple states of phosphorylation [25, 28]. Because normal electrophoresis techniques do not separate the individual tau isoforms, correct identification of the isoform composition of soluble tau requires an efficient dephosphorylation reaction with lambda phosphatase before immunoblotting [35]. Dephosphorylation of tau from normal adult human brain classically produces a downwards shift enabling a more precise separation and identification of the six tau isoforms [25, 35]. We therefore used the same approach in mature human ENS and the gut of htau mice. In sharp contrast to results with human and htau brain samples, lambda phosphatase treatment did not change the charge/mobility of tau bands in colon samples, suggesting that gut tau may have not been efficiently dephosphorylated. Since western blot and immunohistochemical findings showed that tau in gut is in fact phosphorylated, at least at Ser202, Thr205 and Ser396/ Ser404 this raises the possibility that ENS tau is modified in such a way that it is not susceptible to dephosphorylation. This relative resistance to dephosphorylation, which might be due to conformational changes occurring in case of phosphorylation at some specific sites [18], is specific to adult ENS tau as lambda

phosphatase efficiently dephosphorylated tau in rat primary ENS cultures prepared from fetal rats.

In 1978 the first study on cultured myenteric neurons was published [40] and since then there has been a growing interest in this method with several different culture preparations being developed. Using primary cultures of rat ENS [9, 11], we have shown that fetal rat enteric neurons express four isoforms of tau, including the three 3R isoforms. This again stands in sharp contrast to the CNS as rat primary cortical neurons primarily express the 0N3R isoform (our study and [13]). We also show that tau isoforms present in primary ENS culture are phosphorylated under basal conditions and their levels of phosphorylation can be down or upregulated. This suggests that cultured ENS might be helpful to study the regulation of tau expression, phosphorylation and secretion not only in physiological conditions but also in the context of enteric neuropathies [55].

We did not observe any pathological tau changes in the ENS of PSP patients. This stands in sharp contrast with the fact that PSP is considered a prototypical tauopathy of the CNS characterized by tau hyperphosphorylation and truncation [31, 67] and an imbalance in 4R/3R ratio [38]. We have recently proposed that the ENS may be a mirror on to the PD pathology of the CNS since it recapitulates several of the neuronal and glial changes observed in the brain [10, 15, 45]. Our results suggest that, unlike PD, the pathological process in PSP is limited to the CNS and does not involve the ENS. This is supported by the paucity of studies reporting that the peripheral nervous systems are affected in PSP (reviewed in [64]) and by our observation of a lack of glial reaction in the gut in PSP patients [10]. One obvious limitation of this work is that our analysis of PSP samples was restricted to the analysis of the submucosal plexus. We can therefore not rule out that the absence of overt pathological changes in tau in colonic samples from our PSP patients may be due to this limited regional analysis and perhaps different findings would have been obtained had we examined the myenteric plexus. The refinement of new endoscopic procedures, such as full thickness biopsies [50], which provide access to both myenteric and submucosal plexi, may help to answer these critical questions. A second limitation in our study is the lack of neuropathological confirmation of PD and PSP, as the clinical diagnosis of both disorders may have a relatively poor accuracy [1, 42], especially for PD patients for whom signs and symptoms have been present for less than 5 years [1]. In addition, we can not rule out that some of our control subjects may have asymptomatic tauopathy [12].

Conclusions

We have characterised tau in the human and rodent ENS under physiological conditions and tauopathies. We

show differences in tau isoform expression at mRNA and protein level, and in the susceptibility of tau to be dephosphorylated in the CNS and ENS. The data we have acquired on tau in the ENS strongly supports additional future studies aimed at expanding our knowledge of peripheral pathology in neurodegenerative disorders of the CNS and in enteric neuropathies [14].

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Validation of the Cosmo-bio 4R antibody. (PDF 220 kb)

Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; BSA: Bovine serum albumen; CNS: Central nervous system; ENS: Enteric nervous system; ERK: Extracellular signal-regulated kinases; GI: Gastrointestinal; KO: Knockout; MP: Myenteric plexus; PCR: Polymerase chain reaction; PD: Parkinson's disease; PSP: Progressive supranuclear palsy; Ser: Serine; SMP: Submucosal plexus; TBS: Tris-buffered saline; Thr: Threonine

Acknowledgements

We are grateful to Professor Peter Davies (Feinstein Institute for Medical Research, NY, USA) for his generous gift of tau antibodies.

Funding

This work was supported by BBSRC/AstraZeneca (BB/L502601/1 to WN), the National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs, NC/K500343/1 to WN), CECAP, FFGP and PSP France (to AP and PD).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

AL, MAW, AGC, AP, SP, MT and JG performed the experiments and analyzed the data. ED and MRD managed the biobanking and dissected the colonic samples. ED and EC performed the endoscopy. MAW, PD, MN, DPH, MSP and WN designed the research and MAW, WN and PD wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All housing and experimental procedures were carried out in compliance with the local ethical review panel of King's College London under a UK Home Office project license held in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and the European Directive 2010/63/EU. Regarding sigmoid biopsies sampling, the study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest VI*), and registered on ClinicalTrials.gov (Enterolark and ColoBioParker, identifier NCT01618383 and NCT01353183, respectively). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Michael S. Perkinson is an employee of MedImmune.

Publisher's Note

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

Author details

¹Inserm, U1235, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes, France. ²Department of Neurology, CHU Nantes, F-44093 Nantes, France. ³University Nantes, F-44000

Nantes, France. ⁴King's College London, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, Department of Basic and Clinical Neuroscience, Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, Rm 1.23, 5 Cutcombe Road, Camberwell, London SE5 9RX, UK. ⁵Neuroscience, IMED Biotech Unit, AstraZeneca, Cambridge CB21 6GH, UK.

Received: 14 June 2018 Accepted: 6 July 2018

Published online: 23 July 2018

References

- Adler CH, Beach TG, Hentz JG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E et al (2014) Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: dinicopathologic study. *Neurology* 83:406–412. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000641>
- Anderton BH, Brion JP, Couck AM, Davis DR, Gallo JM, Hanger DP et al (1995) Modulation of PHF-like tau phosphorylation in cultured neurones and transfected cells. *Neurobiol Aging* 16:389–397 discussion 398–402
- Andofer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde Y-A et al (2003) Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* 86:582–590
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2004.08.010>
- Barrenschee M, Zorenkov D, Böttner M, Lange C, Cossais F, Scharf AB et al (2017) Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 5:1. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0408-2>
- Beach TG, Adler CH, Sue LJ, Vedders L, Lue L, White III CL et al (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689–702. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0664-3>
- Bussièrre T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin ML, Perl DP et al (1999) Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol* 97:221–230
- Chambonnière ML, Mosnier-Damet M, Mosnier JF (2001) Expression of microtubule-associated protein tau by gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 32:1166–1173
- Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinarat R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, Neunlist M (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol Lond* 586:1963–1975. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149815>
- Clairambault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M et al (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 130:805–815. <https://doi.org/10.1111/jnc.12742>
- Coquenorge S, Duchalais E, Chevalier J, Cossais F, Rolli-Derkinderen M, Neunlist M (2014) Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation* 11:202. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0202-7>
- Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, Abisambra JF, Abner EL, Alafuzoff I et al (2014) Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* 128:755–766. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1349-0>
- Davis DR, Brion JP, Couck AM, Gallo JM, Hanger DP, Ladhani K et al (1995) The phosphorylation state of the microtubule-associated protein tau as affected by glutamate, colchicine and beta-amyloid in primary rat cortical neuronal cultures. *Biochem J* 309(Pt 3):941–949
- De Giorgio R, Bianco F, Latorre R, Caio G, Clavanzani P, Bonora E (2016) Enteric neuropathies: yesterday, today and tomorrow. *Adv Exp Med Biol* 891:123–133. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27592-5_12
- Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H et al (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 50:42–48. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.09.007>
- Duff K, Knight H, Refolo LM, Sanders S, Yu X, Picciano M et al (2000) Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 7:87–98. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0279>
- Dugger BN, Whiteside CM, Maarouf CL, Walker DG, Beach TG, Sue LJ et al (2016) The presence of select tau species in human peripheral tissues and their relation to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 51:345–356. <https://doi.org/10.3233/JAD-150859>
- Dupont-Wallois L, Sautière PE, Cocquerelle C, Bailleul B, Delacourte A, Caillet-Boudin ML (1995) Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated tau proteins in SKNSH-5Y cells treated with okadaic acid. *FEBS Lett* 357:197–201
- Ercan E, Eid S, Weber C, Kowalski A, Bichmann M, Behrendt A et al (2017) A validated antibody panel for the characterization of tau post-translational modifications. *Mol Neurodegener* 12:87. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0229-1>
- Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C et al (2009) Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48:10047–10055. <https://doi.org/10.1021/bi901090m>
- Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ et al (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 29:1010–1018. <https://doi.org/10.1002/mds.25776>
- Gershon MD (1999) The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract* (1995) 34:31–32 35–38, 41–42 passim
- Giancola F, Torresan F, Repossi R, Bianco F, Latorre R, Ioannou A et al (2017) Downregulation of neuronal vasoactive intestinal polypeptide in Parkinson's disease and chronic constipation. *Neurogastroenterol Motil* 29. <https://doi.org/10.1111/nmo.12995>
- Gilb GM, de Silva R, Revez T, Lees AJ, Anderton BH, Hanger DP (2004) Differential involvement and heterogeneous phosphorylation of tau isoforms in progressive supranuclear palsy. *Brain Res Mol Brain Res* 121:95–101. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.11.007>
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 9:4225–4230
- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 189:167–169
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1983–1987
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519–526
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913–4917
- Gu Y, Oyama F, Ihara Y (1996) Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem* 67:1235–1244
- Guillozet-Bongaerts AL, Gajch KE, Libson EG, Cahill ME, Bigio E, Berry RW, Binder LI (2007) Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol* 113:513–520. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0209-6>
- Guo T, Noble W, Hanger DP (2017) Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 133:665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Häk S, Faucheux BA, Szadovitch V, Privat N, Kemeny J-L, Perret-Liaudet A, Hauw J-J (2003) The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med* 9:1121–1123. <https://doi.org/10.1038/nm922>
- Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung K-Y, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH et al (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 282:23645–23654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703269200>
- Hanger DP, Gibb GM, de Silva R, Boutajangout A, Brion J-P, Revez T et al (2002) The complex relationship between soluble and insoluble tau in tauopathies revealed by efficient dephosphorylation and specific antibodies. *FEBS Lett* 531:538–542
- Heumüller-Klug S, Sticht C, Kaiser K, Wink E, Hagl C, Wessel L, Schäfer K-H (2015) Degradation of intestinal mRNA: a matter of treatment. *World J Gastroenterol* 21:3499–3508. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i12.3499>
- Hons IM, Storr MA, Mackie K, Lutz B, Pittman QJ, Mawe GM, Sharkey KA (2012) Plasticity of mouse enteric synapses mediated through endocannabinoid and purinergic signaling. *Neurogastroenterol Motil* 24:e113–e124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01860.x>
- Ingelsson M, Ramasamy K, Russ C, Freeman SH, Orme J, Raju S et al (2007) Increase in the relative expression of tau with four microtubule binding

- repeat regions in frontotemporal lobar degeneration and progressive supranuclear palsy brains. *Acta Neuropathol* 114:471–479. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0280-z>
39. Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW (2003) Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:389–397
 40. Jessen KR, McConnell JD, Purves RD, Burnstock G, Chamley-Campbell J (1978) Tissue culture of mammalian enteric neurons. *Brain Res* 152:573–579
 41. Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JDF, Collinge J (2005) High levels of disease related prion protein in the ileum in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Gut* 54:1506–1508. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.072447>
 42. Joutsa J, Gardberg M, Rötttä M, Kaasinen V (2014) Diagnostic accuracy of parkinsonism syndromes by general neurologists. *Parkinsonism Relat Disord* 20:840–844. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.04.019>
 43. Kovacs GG (2017) Tauopathies. *Handb Clin Neurol* 145:355–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>
 44. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley d, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01368.x>
 45. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley d, Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen J-M et al (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 5:e12728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012728>
 46. Liu C, Götz J (2013) Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One* 8:e84849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084849>
 47. Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoerde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13:989–1002
 48. Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem* 287:32040–32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>
 49. Morris HR, Gibb G, Katzenschlager R, Wood NW, Hanger DP, Strand C et al (2002) Pathological, clinical and genetic heterogeneity in progressive supranuclear palsy. *Brain* 125:969–975. <https://doi.org/10.1093/brain/awf109>
 50. Neunlist M, Coquenlorge S, Aubert P, Duchalais-Dassonneville E, des Varannes SB, 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. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2011.01.041>
 51. Newman J, Rissman RA, Sarscoza F, Kim RC, Dick M, Bennett DA et al (2005) Caspase-deaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol* 110:135–144. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1027-3>
 52. Noble W, Garwood C, Stephenson J, Kinsey AM, Hanger DP, Anderton BH (2009) Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. *FASEB J* 23:739–750. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113795>
 53. Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:83. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083>
 54. Paillusson S, Tasselli M, Lebouvier T, Mahé MM, Chevalier J, Biraud M et al (2010) α -Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J Neurochem* 115:694–706. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06962.x>
 55. Phillips RJ, Walter GC, Ringer BE, Higgs KM, Powley TL (2009) Alpha-synuclein immunopositive aggregates in the myenteric plexus of the aging Fischer 344 rat. *Exp Neurol* 220:109–119. <https://doi.org/10.1016/j.jexpneurol.2009.07.025>
 56. Pooler AM, Usardi A, Evans CJ, Philpott KL, Noble W, Hanger DP (2012) Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol Aging* 33:431.e27–431.e38. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.005>
 57. Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T et al (2008) Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C γ 1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 283:18177–18186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709715200>
 58. Rodríguez-Martín T, Cuchillo-Ibáñez I, Noble W, Nyenya F, Anderton BH, Hanger DP (2013) Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiol Aging* 34:2146–2157. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.015>
 59. Takuma H, Arawaka S, Mori H (2003) Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res Dev Brain Res* 142:121–127
 60. Taleghany N, Oblinger MM (1992) Regional distribution and biochemical characteristics of high molecular weight tau in the nervous system. *J Neurosci Res* 33:257–265. <https://doi.org/10.1002/jnr.490330209>
 61. Tam PK (1990) An immunohistological study of the human enteric nervous system with microtubule-associated proteins. *Gastroenterology* 99:1841–1844
 62. Tasselli M, Chaumette T, Paillusson S, Monnet Y, Lafoux A, Huchet-Cadiou C et al (2013) Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterol Motil* 25:e183–e193. <https://doi.org/10.1111/nmo.12070>
 63. Usardi A, Pooler AM, Seereeram A, Reynolds CH, Derkinderen P, Anderton B et al (2011) Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *FEBS J* 278:2927–2937. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08218.x>
 64. Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H (2010) Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol* 120:1–12. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0706-x>
 65. 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
 66. Wills J, Credle J, Haggerty T, Lee J-H, Oaks AW, Sidhu A (2011) Tauopathic changes in the striatum of A53T α -synuclein mutant mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One* 6:e17953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017953>
 67. Wray S, Saxton M, Anderton BH, Hanger DP (2008) Direct analysis of tau from PSP brain identifies new phosphorylation sites and a major fragment of N-terminally cleaved tau containing four microtubule-binding repeats. *J Neurochem* 105:2343–2352. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05321.x>

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)



ARTICLE 2 :

Tau is upregulated in Crohn's disease through a Nrf2/NDP52 pathway

Tau is upregulated in Crohn's disease through a Nrf2/NDP52 pathway

Alice Prigent, MSc^{a,b,c}, Arthur Lionnet, MD^{a,b,d}, Emilie Durieu, MSc^{a,b,c}, Arnaud Bourreille^{a,b,c}, MD, PhD^{a,b,c}, Michel Neunlist, PhD^{a,b,c}, Malvyne Rolli-Derkinderen, PhD^{a,b,c} and Pascal Derkinderen, MD, PhD^{a,b,d*}

^aInserm, U1235, Nantes, F-44035, France

^bUniversity Nantes, Nantes, F-44035, France

^cCHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44093, France

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

***Corresponding author:** Pascal Derkinderen, Inserm U1235, 1 place Gaston Veil, 44035 Nantes, France.

Tel: 0033(0)240165202; Fax: 0033(0)240165203; E-mail: derkinderenp@yahoo.fr;

pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Keywords: Tau; colon; enteric nervous system; inflammatory bowel disease; Crohn's disease; inflammation.

Author Contributions : AP, AL, ED and MRD performed the experiments. AB, ED, MN and MRD were involved in tissue sampling and biobanking. AB performed the colonoscopy and biopsies in CD patients. MRD performed the biopsies for control individuals. MRD and PD supervised the study, wrote the first draft.

Disclosures : The authors disclose no conflicts.

Introduction

Crohn's disease (CD) is a type of inflammatory bowel disease, which is characterized by chronic remitting and relapsing inflammation of the entire gastrointestinal (GI) tract. Although the precise etiology of CD is unknown, it is generally accepted that it develops through an exaggerated immune response to luminal antigens in genetically susceptible individuals leading to intestinal epithelium inflammation and damage (Torres et al. 2017). The pathological process in CD is however not limited to the epithelial lining but extends to all components of the GI wall including the enteric nervous system (ENS) whose structure and neurochemical phenotype are altered during active CD (Brierley and Linden 2014). The major structural abnormalities thus far described in CD include architectural alterations of the plexuses, nerve hypertrophy and hyperplasia along with alterations of neuronal cell bodies (Oehmichen and Reifferscheid 1977; Geboes and Collins 1998). Regarding neurochemical phenotype, the two most comprehensive studies found an increased number of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerve cell bodies in both the myenteric and submucosal plexuses (Belai et al. 1997; Schneider et al. 2001).

The ENS structure and neurochemistry are similar to those of the CNS, therefore pathogenic mechanisms that cause CNS disorders might also lead to ENS dysfunction, and vice versa (Derkinderen et al. 2011). Over the past two decades, the progresses in molecular genetic and neuropathology enabled a better understanding of the pathogenesis of neurodegenerative disorders. The observation that abnormal protein accumulation is characteristic of a particular disease sets has led to a neuropathological classification according to the composition of the abnormal protein aggregates. The most common neurodegenerative disorders are now classified based on the abnormal accumulation of alpha-synuclein (Spillantini et al. 1997) or tau (Brion et al. 1986) and hence referred to as synucleinopathies (with Parkinson's disease being the prototypical type) or tauopathies (with Alzheimer's disease being the most common), respectively (Spillantini and Goedert 1998; Galvin et al. 2001). However, it should be noted that the pathological distinction among these disorders is sometimes not so clear as the co-occurrence of alpha-synuclein and tau deposits has been reported in PD (Sengupta et al. 2015). Several independent studies have shown that enteric neurons, like their CNS counterparts, also express alpha-synuclein (Böttner et al. 2012; Preterre et al. 2015; Corbillé et al. 2017) and tau (Lionnet et al. 2018; Dugger et al. 2019) and we recently demonstrated that alpha-synuclein is upregulated in inflamed segments of Crohn's colon (Prigent et al. 2019). These latter findings, together with the results of recent epidemiological and genetical studies (reviewed in (Rolli-Derkinderen et al. 2019)), support the existence of a close relationship between Parkinson's and Crohn's disease. In contrast to alpha-synuclein, no data are available on the expression and phosphorylation patterns of enteric tau in CD. Here, we examined the expression levels of tau isoforms, their phosphorylation profile and truncation in colonic biopsies specimens from CD patients and compared them to samples from controls. Additional pharmacological experiments were performed in primary cultures of rat enteric neurons. Our results show the upregulation of two main human tau

isoforms in the ENS in CD, which results from a decrease in protein clearance via an Nrf2 pathway. Our findings, which provide the first detailed characterization of tau in CD, suggest that the key proteins involved in neurodegenerative disorders such as alpha-synuclein and tau, might also play a role in CD.

Material and methods

Participants, biopsies and GI samples

A total of 32 subjects participated in this study, 16 CD patients and 16 healthy controls who had a normal colonoscopy for colorectal cancer screening (supplemental file 1; 10 CD patients and 10 controls from the current study had their biopsies previously analyzed in (Prigent et al. 2019) for the analysis of alpha-synuclein expression). The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (Comité de Protection des Personnes Ouest VI). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer before the endoscopic procedure. All procedures were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the no. DC-2008-402. CD patients had 4 biopsies (2 in an inflamed and 2 in a non-inflamed area) taken during the course of a colonoscopy. For CD patients, 6 biopsies were taken in the inflamed and non-inflamed area during the course of a colonoscopy and stored in RA1 buffer until further analysis.

Primary culture of rat ENS

Primary cultures of rat ENS were generated and cultured as previously described (Coquenlorge et al., 2014). Cells were treated with 10 μ M sulforaphane or MG132 for 12h.

Western Blot

Two biopsies per patient stored in RA1 buffer were pooled and lysed using the “Precellys 24” tissue homogenizer (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) followed by sonication with “vibracell 75 186” device (Sonics, Newton CT, USA). The total proteins were precipitated and prepared for Polyacrylamide Gel Electrophoresis using protein precipitator and resuspension buffer PSB/TCEP (Protein solving buffer and (tris(2-carboxyethyl)phosphine) TCEP reducing agent) from the NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer’s instructions. Total protein was quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Cillebon sur Yvette, France). Equal amounts of lysate were separated and analyzed by Western blot as described previously using Invitrogen NuPage Novex 10% Bis Tris MiniGels™ (Prigent et al. 2019). The primary tau antibodies used are listed in Table 2.

To confirm equal protein loading, membranes were probed with mouse monoclonal anti-PGP 9.5 (1:2,000; Ultraclone limited, Isle of Wight, UK) and mouse monoclonal anti- β -actin antibody (1:10,000; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J software. To allow comparison between different films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls. All data shown are mean \pm standard error of the mean (SEM). For statistical comparison between groups, an analysis of variance followed by a Kruskal-Wallis test was performed. Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

Sarkosyl extraction and ultracentrifugation

For sarkosyl extraction of tau, tissues were homogenized in 50 mM Tris buffered saline (TBS, pH 7.4) containing 2 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 10% sucrose. Samples were centrifuged at 12,000 g for 20 min (4 °C) to remove the cells debris and sarkosyl (10% v/v) was added to the resultant supernatant to give a final concentration of 1% (v/v). Samples were mixed for 30 min at 4°C, then ultracentrifuged at 100,000 g for 1 h at 21°C. The supernatant was collected and the pellet washed twice with 1% (v/v) sarkosyl before solubilization in 2× sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer (National Diagnostics). The two fractions produced comprised (i) low speed supernatant, (ii) sarkosyl-soluble tau, and (iii) sarkosyl-insoluble tau. Proteins in the samples were resolved by SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE) and processed for immunoblotting. Samples of frozen temporal cortex from one post-mortem human brain with Alzheimer's disease (AD) and one control subject were obtained from the Neuropathology Department of Angers (Dr Franck Letournel) to serve as a control.

Primary antibodies used in this study.

Name	Specificity	Epitope (a.a)	Source and dilution
A0024 Tau	All tau isoforms	243-441 (2N4R)	Dako, rp (WB 1:1,000 ; IHC 1:500)
TAU-5	All tau isoforms	210- 241 (2N4R)	ThermoFisher, mm (WB 1:1,000)
Tau-1	All tau isoforms	189-207 (2N4R)	Merck, mm, clone PC1C6 (WB 1:2,000)
Anti tau RD3	3R tau Isoforms	267-282 (2N3R)	Merck, mm, clone 8E6 (WB 1:1,000; IHC 1:500)
Anti tau RD4	4R tau isoforms	275-291 (2N4R)	Merck, mm, clone 1E1/A6 (WB 1:1,000)
Anti tau T22	Tau oligomers	NS	Merck, rp (WB 1:2,000; IHC 1:1,000)
PHF13	Tau @ S396	Tau @ S396	Cell Signaling, mm (WB 1:1,000)
Tau -421	Troncated tau		

Table 2. The name, specificity, epitope, source and dilution of the antibodies used in this study are shown. Abbreviations are amino-acids (a.a.); immunohistochemistry (IHC); mouse monoclonal (mm); not specified (NS); rabbit polyclonal (rp); western blot (WB).

RNA extraction and RT-PCR

For colonic tissues stored in RA1 buffer, RNA extraction was performed with NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France, Cat# 740966) according to the manufacturer's instructions. One μ g purified mRNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France, Cat # 18080044). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France, Cat# AB4166B) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies, Cat# 4376600). The following primers were used:

MAPT, forward: 5'-AGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTC-3'; reverse: 5'-GGGTTTCAATCTTTTTATTCCTCC-3'

Ribosomal protein S6 # NM_001010.2, Forward: 5'-AAGCACCCAAGATTCAGCGT-3'; Reverse: 5'-TAGCCTCCTCATTCTCTTGGC-3'

Statistics

All data shown are mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad software version 8.00 (San Diego California, USA). For comparisons of means between groups, Kruskal-Wallis tests were performed. Differences were deemed statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Tau expression is increased in Crohn's disease

We first analyzed the expression levels of tau in colonic biopsies of CD and controls by Western blot. A significant 8- and 4-fold increase in tau protein expression was observed in the inflamed area of CD patients when compared to controls, after normalization to the amount of the neuronal protein PGP 9.5 and β -actin, respectively (Figure 1a and supplemental figure 1). By contrast, no significant differences were observed when the non-inflamed area was compared to controls (Figure 1a and supplemental figure 1). We have recently shown that 1N3R and 0N4R are the two main tau isoforms expressed in the adult human ENS and that these two isoforms are phosphorylated under physiological conditions (Lionnet et al. 2018). Using 3R and 4R isoform specific antibodies, we found that both 1N3R and 0N4R tau isoforms were upregulated in the inflamed area in CD (Figure 1b). We next examined the phosphorylation state of tau with a phospho-specific antibody that detect tau phosphorylated at Ser396. After normalizing to total tau, the amount of phosphorylated tau was not different between CD samples and controls (Figure 1c). Truncated tau is present in the pathological deposits observed in CNS tauopathies, including PSP and Alzheimer's disease (Newman et al. 2005). In order to determine whether tau is C-terminally truncated in the enteric neurons in CD, colonic biopsies were analyzed using a monoclonal antibody that specifically recognizes tau cleaved at Asp421. After normalizing to total tau, the amount of truncated tau was

dramatically decreased in CD inflamed area when compared to either non-inflamed area or controls (Figure 1d).

The upregulation of tau in Crohn's disease is not accompanied with more insoluble or oligomeric forms of the protein

To examine whether tau upregulation is associated with protein aggregation, we used T22, a recently developed tau oligomer-specific antibody (Lasagna-Reeves et al. 2012). As expected, this antibody detected slower-tau migrating bands in AD brain when compared to control brain (Figure 2a). However, no difference in the banding pattern was observed when this antibody was used to compare biopsies lysates from CD and controls (Figure 2a). In CNS tauopathies, the biochemical characterization of tau pathological involves well-standardized protocols based on the use of sarkosyl (Hasegawa et al. 1992). Using this method along with the T22 antibody, we showed that the levels of sarkosyl-insoluble tau was increased in Alzheimer's disease brain when compared to control brain (Figure 2b). In contrast, no sarkosyl-insoluble tau was detected in the GI tract samples from either CD patients or controls (Figure 2b).

Tau upregulation in Crohn's disease is specific as not observed for MAP2c, β III-tubulin and synapsin

To determine whether the upregulation of tau is specific to this microtubule associated protein, we analyzed the expression levels of its sequence homologue MAP2c along with two of its interacting proteins, β III-tubulin and synapsin I (Littauer et al. 1986; Liu et al. 2016). Unlike tau, the amounts of MAP2c and β III-Tubulin were not different between CD and controls (Figure 3). On the contrary, synapsin I was significantly decreased in inflamed and non-inflamed colonic biopsies from CD patients when compared to controls (Figure 1d).

The increase in tau expression likely results from a deregulated Nrf2/NDP52 autophagy pathway

We next sought to determine the mechanisms by which tau is upregulated in CD. Using RT-PCR, we found a decrease in tau mRNA in inflamed-CD samples as compared to controls (Figure 4a). Additionally, we did not observe any difference between CD and controls when samples were analyzed by Western Blot for the amounts of TRIM 28, a transcriptional regulator that modulates both alpha-synuclein and tau levels (Rousseaux et al. 2016) (Figure 4b). These results demonstrate that the higher amount of tau observed in CD does not result from an increase in tau transcription and suggest that other mechanisms such as modulation in tau proteostasis might be involved. A sizeable body of evidence have shown that tau could be degraded through the proteasome/ubiquitin pathway or turned over by the autophagy-lysosome pathway. We first investigated the possible role of the proteasome/ubiquitin pathway by analyzing ubiquitin immunoreactivity in whole biopsy lysates by Western blot. The banding pattern was markedly different between CD and controls, with some stronger immunoreactive bands around 25, 35 and 50-60

kDa being observed in inflamed CD samples (Figure 4c). To further investigate the possible contribution of the proteasome to the degradation of tau in enteric neurons, we examined the levels of tau in primary culture of rat ENS in the presence of the proteasome inhibitor MG132. In line with our previous results, primary culture of rat ENS express four tau isoforms (0N3R, 1N3R/0N4R and 2N3R), which migrate as a triplet of 50, 53 and 58 kDa bands on SDS PAGE (Lionnet et al. 2018) and treatment with MG132 decreased the amount of all these tau isoforms (Figure 4c). These findings, which suggest that proteasome inhibition is not involved in tau upregulation in enteric neurons, are in agreement with two recent studies that showed that proteasome inhibition in primary cortical neurons increased tau clearance (Krüger et al. 2012; Jo et al. 2014). A recent study showed that the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) decreased the levels of tau by inducing the autophagy adaptor protein NDP52 (also known as CALCOCO2) in CNS neurons (Jo et al. 2014). When we analyzed the expression levels of these proteins in colonic biopsies, we found that the amounts of both proteins were markedly decreased in the CD inflamed area. To further investigate the possible role of Nrf2, we used the Nrf2 activator sulforaphane. When applied to primary culture of ENS, sulforaphane decreased the expression of all tau isoforms. As a whole, these findings strongly suggest that the Nrf2/NDP52 autophagy, but not the ubiquitin/proteasome pathway, is involved in tau upregulation.

References

- Belai A., Boulos P. B., Robson T., Burnstock G. (1997) Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* **40**, 767–774.
- 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.
- Brierley S. M., Linden D. R. (2014) Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 611–627.
- Brion J. P., Flament-Durand J., Dustin P. (1986) Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet* **2**, 1098.
- Corbillé A.-G., Preterre C., Rolli-Derkinderen M., Coron E., Neunlist M., Lebouvier T., Derkinderen P. (2017) Biochemical analysis of α -synuclein extracted from control and Parkinson's disease colonic biopsies. *Neurosci. Lett.* **641**, 81–86.
- 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.
- Dugger B. N., Hoffman B. R., Scroggins A., Serrano G. E., Adler C. H., Shill H. A., Belden C. M., et al. (2019) Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neurosci. Lett.* **696**, 132–139.
- Galvin J. E., Lee V. M., Trojanowski J. Q. (2001) Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch. Neurol.* **58**, 186–190.
- Geboes K., Collins S. (1998) Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* **10**, 189–202.

- Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **267**, 17047–17054.
- Jo C., Gundemir S., Pritchard S., Jin Y. N., Rahman I., Johnson G. V. W. (2014) Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun* **5**, 3496.
- Krüger U., Wang Y., Kumar S., Mandelkow E.-M. (2012) Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiol. Aging* **33**, 2291–2305.
- Lasagna-Reeves C. A., Castillo-Carranza D. L., Sengupta U., Sarmiento J., Troncoso J., Jackson G. R., Kaye R. (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **26**, 1946–1959.
- Lionnet A., Wade M. A., Corbillé A.-G., Prigent A., Paillusson S., Tasselli M., Gonzales J., et al. (2018) Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* **6**, 65.
- Littauer U. Z., Givon D., Thierauf M., Ginzburg I., Ponstingl H. (1986) Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 7162–7166.
- Liu C., Song X., Nisbet R., Götz J. (2016) Co-immunoprecipitation with Tau Isoform-specific Antibodies Reveals Distinct Protein Interactions and Highlights a Putative Role for 2N Tau in Disease. *J. Biol. Chem.* **291**, 8173–8188.
- Newman J., Rissman R. A., Sarsoza F., Kim R. C., Dick M., Bennett D. A., Cotman C. W., Rohn T. T., Head E. (2005) Caspase-cleaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol.* **110**, 135–144.
- Oehmichen M., Reifferscheid P. (1977) Intramural ganglion cell degeneration in inflammatory bowel disease. *Digestion* **15**, 482–496.
- 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.
- Prigent A., Lionnet A., Durieu E., Chapelet G., Bourreille A., Neunlist M., Rolli-Derkinderen M., Derkinderen P. (2019) Enteric alpha-synuclein expression is increased in Crohn's disease. *Acta Neuropathol.* **137**, 359–361.
- Rolli-Derkinderen M., Leclair-Visonneau L., Bourreille A., Coron E., Neunlist M., Derkinderen P. (2019) Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J. Neurol.*
- Rousseaux M. W., Haro M. de, Lasagna-Reeves C. A., De Maio A., Park J., Jafar-Nejad P., Al-Ramahi I., et al. (2016) TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both alpha-synuclein and tau. *Elife* **5**.
- Schneider J., Jehle E. C., Starlinger M. J., Neunlist M., Michel K., Hoppe S., Schemann M. (2001) Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **13**, 255–264.
- Sengupta U., Guerrero-Muñoz M. J., Castillo-Carranza D. L., Lasagna-Reeves C. A., Gerson J. E., Paulucci-Holthausen A. A., Krishnamurthy S., Farhed M., Jackson G. R., Kaye R. (2015) Pathological interface between oligomeric alpha-synuclein and tau in synucleinopathies. *Biol. Psychiatry* **78**, 672–683.
- Spillantini M. G., Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **21**, 428–433.
- 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.

Torres J., Mehandru S., Colombel J.-F., Peyrin-Biroulet L. (2017) Crohn's disease. *Lancet* **389**, 1741–1755.

Legends to figures

Figure 1. Expression levels, phosphorylation state and truncation of tau protein in colonic biopsies from patients with Crohn's disease (CD). (a) Colonic biopsies lysates from 16 CD patients and 16 controls (C) (see supplemental table 1 for subject details) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against tau (TAU-5 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) and β -actin (β -actin IB) (raw immunoblots are provided in supplemental figure 1). For CD patients, biopsies taken in non-inflammatory area (NI, NI-CD) and inflammatory area (I, I-CD) were analyzed separately. Tau immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP 9.5 and β -actin and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 16 samples for CD patients control subjects (C), *** $p < 0.001$ (b) Representative immunoblots showing the expression of 3R and 4R tau using specific isoforms antibodies (8 CD and 8 controls were analyzed) (c) Colonic biopsies lysates from 16 CD patients and 16 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against total tau (TAU-5 IB) and phosphorylated tau at serine 396 (PHF13 IB). Phosphorylated tau immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of total tau and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 16 samples for CD patients and control subjects (d) Colonic biopsies lysates from 16 CD patients and 16 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against total tau (TAU-5 IB) and truncated tau at Asp 421 (TAU-421). In the upper panel, the membrane was probed with both antibodies. TAU-421 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of total tau and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 16 samples for CD patients and control subjects, * $p < 0.01$.

Figure 2. Analysis of sarkosyl-insoluble tau and oligomeric forms of Tau in colonic biopsies from patients with Crohn's disease. (a) Colonic biopsies lysates from 4 CD patients (#707, 517, 539 and 620) and 4 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against Tau T22.

Figure 3. Expression levels of MAP2c, synapsin I and β -III tubulin in colonic biopsies from patients with Crohn's disease (CD). Colonic biopsies lysates from 6 CD patients (#242, 243, 244, 248, 528 and 539) and 6 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against MAP2c (MAP2c IB),

synapsin I (Synapsin I IB) and β -III tubulin (β -actin IB). MAP2c, synapsin I and β -III tubulin immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5 and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 6 samples for CD patients and control subjects.

Figure 4. Transcriptional regulation of tau in Crohn's disease and evaluation of the possible role of the ubiquitin/proteasome pathway in tau upregulation. (b) Colonic biopsies lysates from 9 CD patients (#381, 387, 436, 458, 461, 516, 517, 533 and 620) and 9 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against TRIM28 (TRIM28 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) and β -actin (β -actin IB). TRIM28 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP 9.5 and expressed as a percentage of the average of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 9 samples for CD patients and control subjects. (c) Representative immunoblots of ubiquitin levels in biopsies lysates from CD patients and control subjects. The arrows show some of the bands whose levels varied between CD and controls. (d) Primary culture of rat ENS were treated or not with 10 μ M MG132 for 12h and 15 μ g of cell lysates were subjected to immunoblot analysis using A0024 Tau, PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) and β -actin (β -actin IB) antibodies.

Figure 5 : The increase in tau expression likely results from a deregulated Nrf2/NDP52 autophagy pathway. (a) Colonic biopsies lysates from 6 CD and 6 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against NFR2 and NDP52. NFR2 and NDP52 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5 and β -actin and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 6 samples for CD patients and control subjects, * $p < 0.05$. (b) Primary culture of rat ENS were treated or not with 10 μ M sulforaphane for 48h and 15 μ g of cell lysates were subjected to immunoblot analysis using A0024 Tau, PHF13 (PHF13 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) and β -actin (β -actin IB) antibodies. Values represent mean \pm SEM (n=4, ** $p < 0.01$)

Figure 1

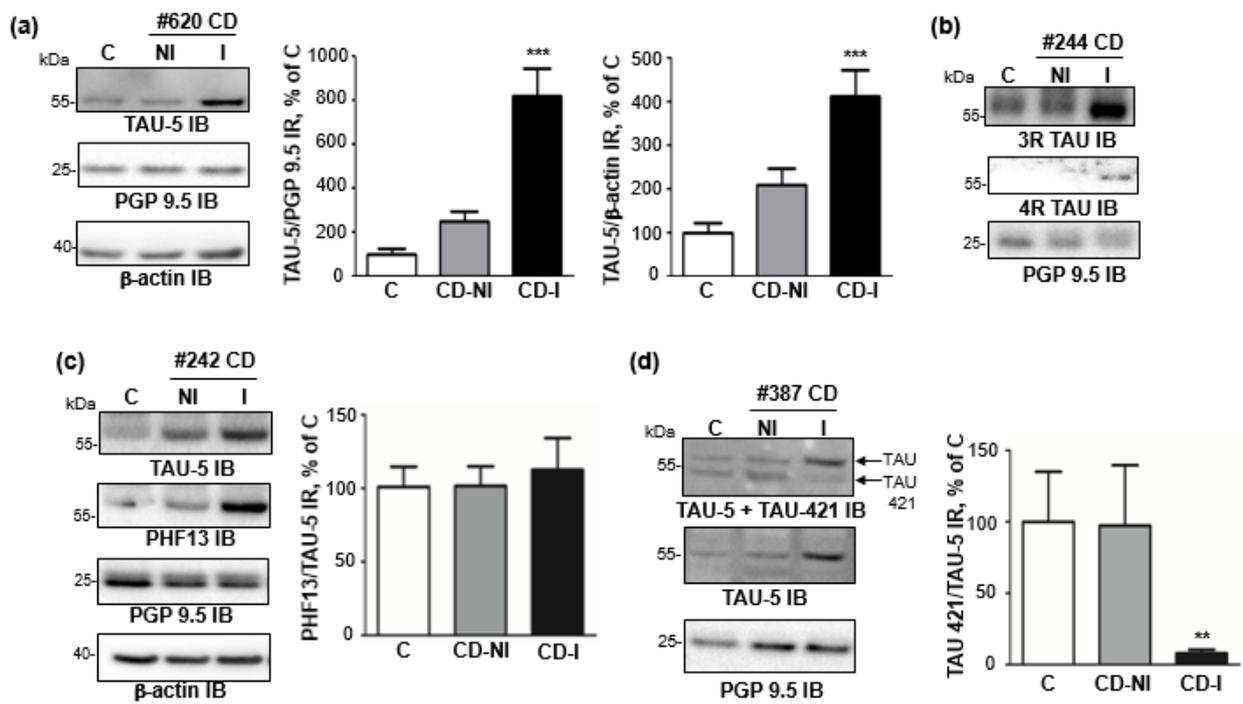


Figure 2

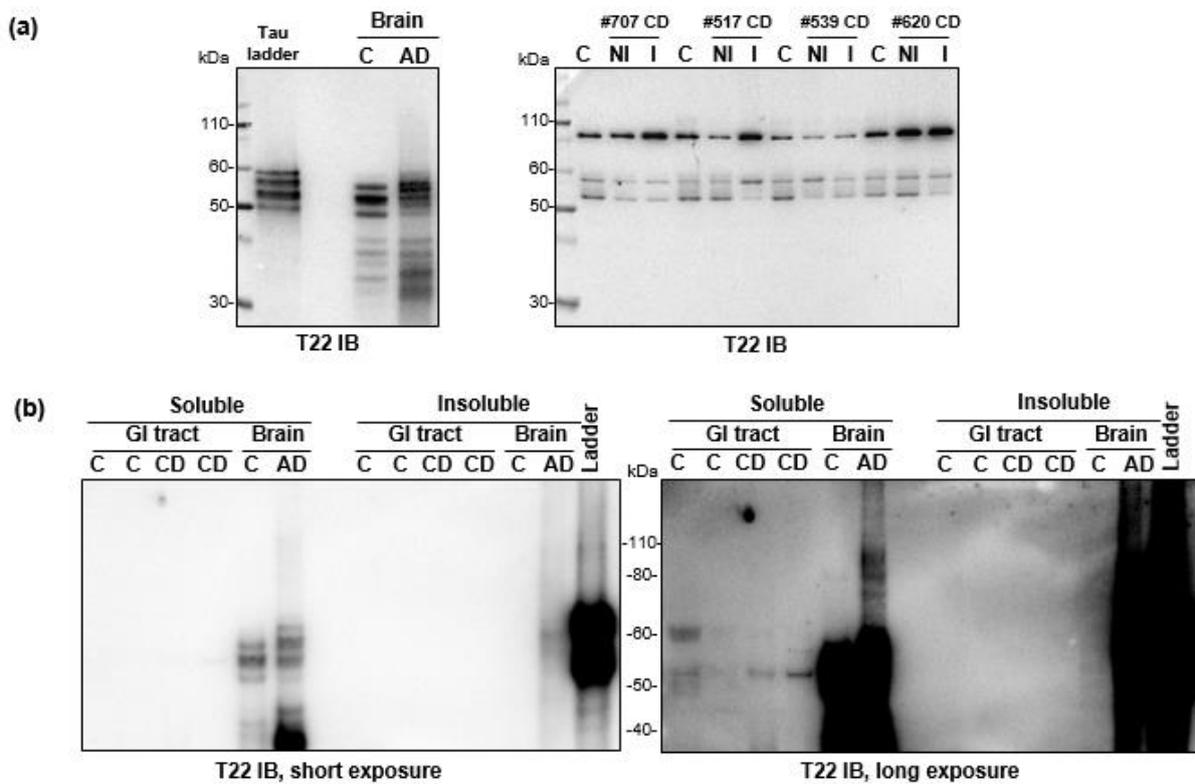


Figure 3

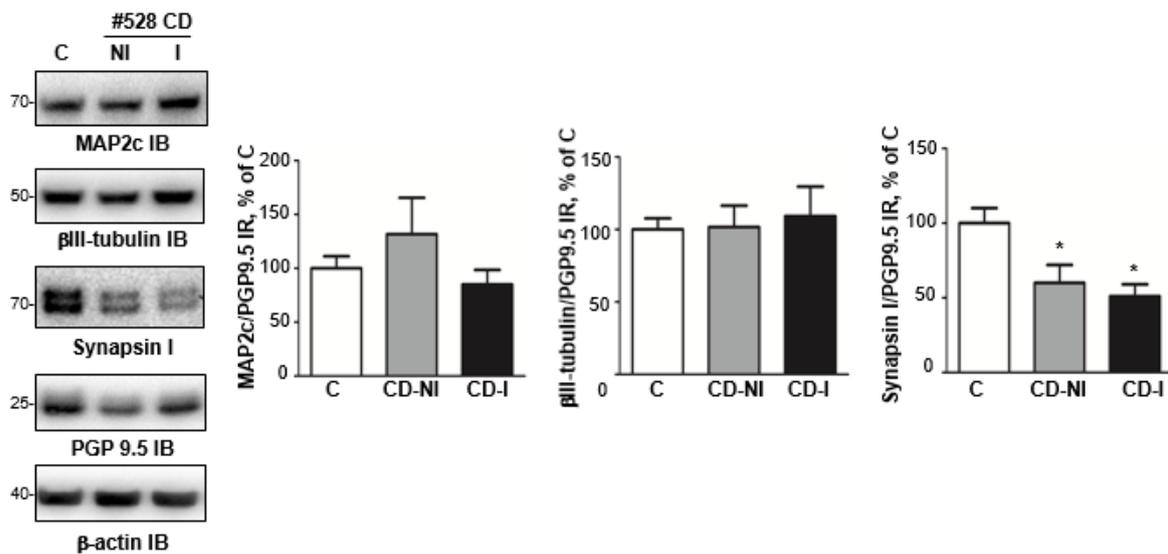


Figure 4

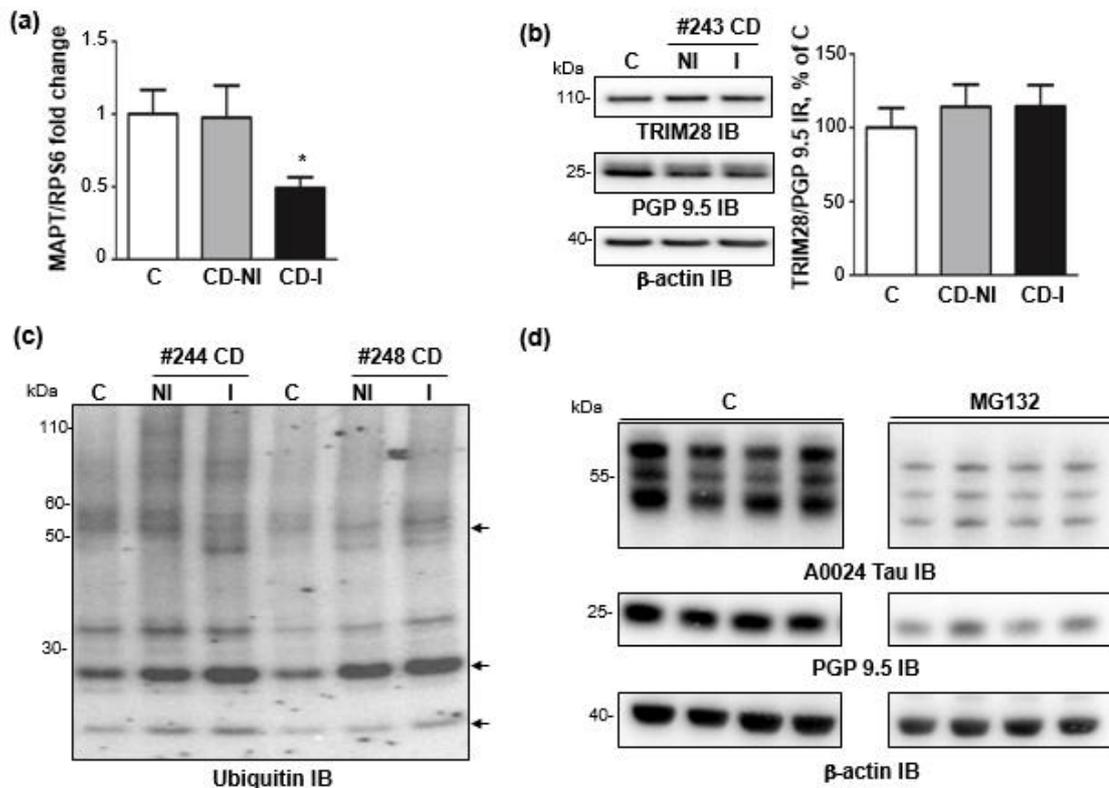
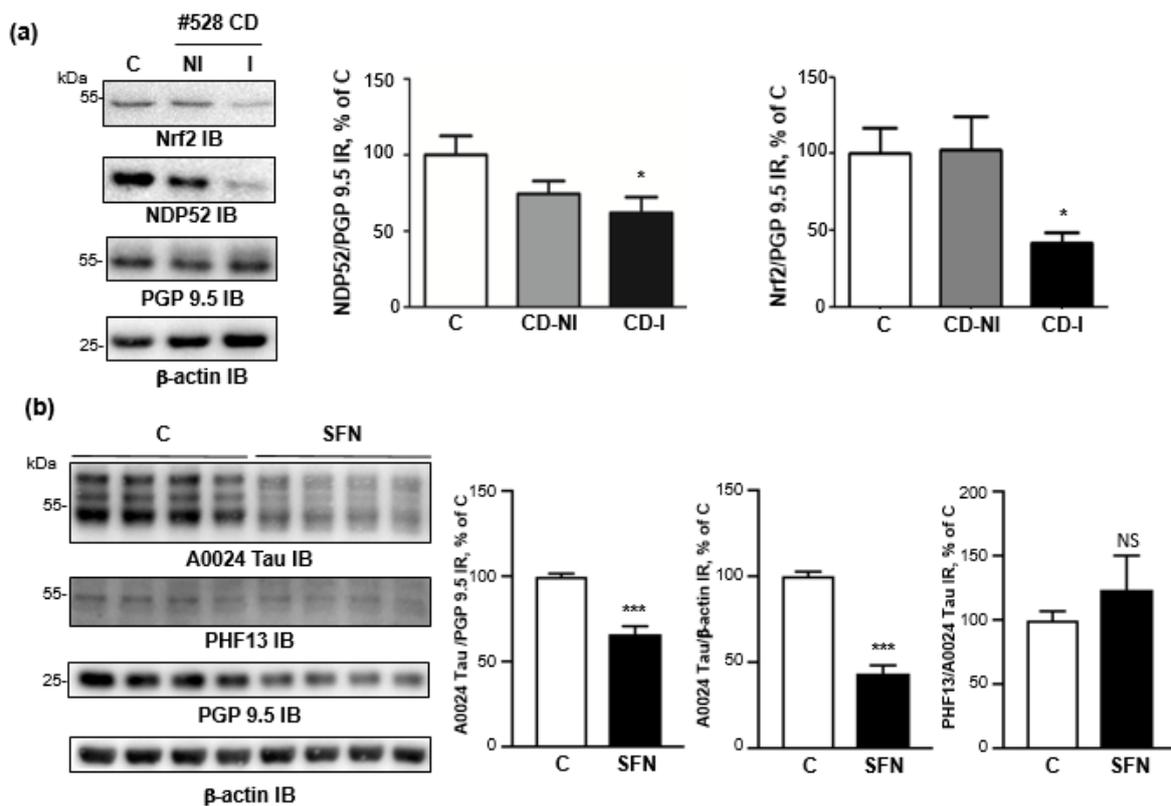


Figure 5



III. Discussion

Ces travaux de thèse représentent les premières études explorant le rôle de l'inflammation intestinale aiguë et chronique sur la régulation de l' α -synucléine dans les neurones entériques.

Dans notre première étude, nous montrons que des stimuli pro-inflammatoires médiés par le LPS et TI régulent à la baisse l'expression de l' α -synucléine, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine dans un modèle *in vitro* de culture primaire des SNE de rat, mais pas dans la culture primaire des neurones corticaux de rat ni dans les cellules HEL. Une explication possible serait que cette régulation ne soit pas directement liée à l'action des cytokines proinflammatoires et LPS sur les neurones, mais passerait premièrement par une activation des cellules gliales entériques, qui en réponse libèreraient des médiateurs gliaux inflammatoires. En effet, les neurones corticaux et les cellules HEL ont été cultivés seuls tandis que la culture primaire de SNE de rat contient des cellules musculaires, de la glie et des neurones. Ainsi, il serait intéressant de reproduire les expérimentations mais cette fois-ci, dans des cultures de neurones entériques seuls, et également de tester l'effet des médiateurs gliaux, tels que la PGE2, sur la régulation de l' α -synucléine entérique. Une autre explication pourrait venir des différences intrinsèques entre les sous-types de neurones. Dans leur étude, Rideout et al. ont comparé la régulation de l' α -synucléine entre différents sous-types de neurones du SNC en culture primaire chez le rat et ont montré que le facteur de croissance de base des fibroblastes favorisait l'expression de l' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques, mais pas dans les neurones GABAergic ni les neurones corticaux (Rideout et al., 2003). De plus, l'augmentation intracellulaire de l'AMPC, induite soit par des analogues non hydrolysables, soit par l'activation de l'adrénorécepteur β_2 , régule à la baisse l'expression de l' α -synucléine dans des PC12 et dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (Stefanis et al., 2001; Mittal et al., 2017), tandis qu'une régulation opposée a été observée dans la culture primaire de SNE (Paillusson et al., 2010). Une telle régulation spécifique de l' α -synucléine pourrait être pertinente dans le contexte de la MP puisque la perturbation de la régulation transcriptionnelle dans différentes populations neuronales pourrait sous-tendre l'hétérogénéité clinique et neuropathologique observée dans ce trouble neurodégénératif (Leclair-visonneau et coll., 2018).

Jusqu'à présent, la plupart des études existantes sur l'expression de l' α -synucléine dans les neurones ont identifié la voie ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) comme étant un acteur clé. L'induction de l' α -synucléine par les facteurs de croissance dans les cellules PC12 dépend de la voie ERK (Clough et Stefanis, 2007), tout comme la régulation de l'expression de l' α -synucléine par l'activité neuronale dans les cultures de SNE (Paillusson et al., 2010). Nous montrons dans cette étude que la voie de signalisation p38 est également impliquée de façon critique dans la régulation de l'expression de l' α -synucléine. Contrairement aux neurones corticaux, deux inhibiteurs différents de p38 ont considérablement augmenté les niveaux d'expression de l' α -synucléine dans la culture primaire de SNE, suggérant ainsi que

l' α -synucléine est, en condition basale, régulée à la baisse dans les neurones entériques par une voie p38 dépendante. De plus, nous avons montré que les effets du TI ou du LPS sur l'expression de l' α -synucléine entérique étaient bloqués en présence de l'inhibiteur p38, le SB203580. Nos résultats actuels, ainsi que nos résultats antérieurs (Paillusson et al., 2010), indiquent que l'inhibiteur U0126 de la voie ERK et l'inhibiteur SB203580 de la voie p38 ont un effet opposé sur l'expression de l' α -synucléine dans la culture primaire de SNE, induisant une diminution et une augmentation de la régulation de l' α -synucléine, respectivement. Cela renforce l'existence d'un réseau de signalisation cellulaire dans les neurones entériques dans lequel l'expression de l' α -synucléine est régulée par un échange entre ERK et p38.

Afin d'étendre les résultats obtenus *in vitro*, nous avons étudié les niveaux d'expression de l' α -synucléine dans des modèles murins d'inflammation colique induite par le DSS. En accord avec nos résultats obtenus *in vitro*, nous avons observé une diminution de l'expression de l' α -synucléine chez les souris ayant reçu un traitement aigu de DSS. En revanche, lorsque l'on a utilisé une administration chronique de DSS, nous n'avons observé aucun changement d'expression de l' α -synucléine. Un tel écart pourrait s'expliquer par les niveaux inférieurs de cytokines pro-inflammatoires du côlon qui ont été retrouvés dans ce modèle par rapport au traitement aigu (Garrido-Gil et al., 2018). Ces observations renforcent encore le possible rôle des cytokines pro-inflammatoires et en particulier du TNF- α et de l'IL-1 β dans la régulation du niveau d'expression d' α -synucléine entérique. Cependant, il serait intéressant d'étudier si l' α -synucléine peut être régulée à la hausse dans un modèle de colite plus progressive, induite par l'administration de 5 à 6 cycles répétés de DSS.

Dans notre deuxième étude, nous avons poursuivi l'étude de l'inflammation mais cette fois-ci dans le côlon de patients atteints de MICI: la MC et la RCH. Nous avons observé une augmentation significative de l'expression de l' α -synucléine uniquement dans les biopsies coliques, contenant les neurones de la muqueuse et de la sous-muqueuse, de patients atteints de la MC comparés aux témoins, mais pas au cours de la RCH. Afin de déterminer si cette régulation pouvait être transmurale, nous avons analysé, par marquage IHC, les neurones contenus dans les ganglions du plexus myentérique. De façon similaire, nous retrouvons une augmentation significative de l'expression de l' α -synucléine uniquement au cours de la MC comparés aux témoins et aux RCH. Bien que ces deux maladies soient regroupées sous le terme MICI et qu'elles partagent des symptômes et des complications, la MC et la RCH sont deux troubles différents d'un point de vue physiopathologique. Tandis que la MC est principalement associée aux réponses immunitaires de type Th1, la RCH présente une réponse inflammatoire médiée par des lymphocytes Th2 (Christophi et al., 2012). Nous pourrions donc supposer que certaines cytokines pro-inflammatoires et/ou réponses inflammatoires qui sont activées au cours de la MC, mais pas dans la RCH, soient impliquées dans la régulation de l'expression de l' α -synucléine. Notre analyse par PCR (données non publiées) nous

a permis d'observer une forte diminution de l'ARNm codant pour l' α -synucléine, suggérant que cette régulation à la hausse ne serait pas liée à un mécanisme transcriptionnel mais serait due à une diminution ou une absence de dégradation de l' α -synucléine. Ce résultat est également conforté par l'absence de modification de TRIM28 (résultat non publié), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l' α -synucléine. Dans notre étude menée sur l'expression de Tau au cours de la MC, nous avons mis en évidence, dans les biopsies en zone inflammée, une diminution de deux facteurs de transcription, le NRF2 et le NDP52, impliqués dans l'autophagie (Jo et al., 2014). Ce qui nous laisse penser que, chez les patients Crohn, l' α -synucléine serait moins dégradée dû à une diminution de l'activité autophagique. Parallèlement, nous avons analysé la présence d'agrégats par Dot Blot, technique permettant de retenir sur des membranes d'acétate de cellulose de 0.44 μ m les protéines sous formes agrégées. Nous avons réussi à détecter des agrégats dans les extraits cellulaires issus du SNC de patients atteints de DCL, cependant, aucun agrégat n'a été détecté chez les patients Crohn. Cette technique pourrait ne pas sembler être la plus sensible mais nous avons également collaboré avec l'équipe de Ronald Melki, qui a mis au point une technique de détection par amplification beaucoup plus sensible et spécifique, et ils n'ont également pas détecté d'agrégats dans le côlon de patients Crohn. Toutefois, cette absence d'agrégats n'est pas surprenante puisque que les patients Crohn inclus dans cette étude ont une moyenne d'âge de 33 ans et ont été diagnostiqués pour une MC depuis moins de 10 ans. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure le fait que des agrégats puissent survenir ultérieurement et il serait ainsi intéressant de reproduire ces expérimentations dans des biopsies de patients plus âgés et ayant une inflammation chronique qui perdure depuis plusieurs années.

Les résultats de ces deux études tendent à montrer que l'inflammation intestinale aiguë régulerait à la baisse l' α -synucléine tandis qu'une inflammation chronique augmenterait sa régulation via une absence de dégradation de l' α -synucléine. Ces dernières données renforcent donc le lien possible entre la MC et la MP, lien déjà soulevé par les études épidémiologiques et génétiques (NOD2 et LRRK2), et le rôle causal de l'inflammation gastro-intestinale dans le développement de la MP. D'autres études *in vitro* sont nécessaires afin d'identifier si les voies de signalisation impliquées sont partagées entre les systèmes nerveux central et entérique. Une telle approche devrait nous aider à mieux comprendre le rôle de l'inflammation systémique dans la MP. De plus, comme la protéine LRRK2 lie génétiquement la MP et la MC, il serait intéressant d'étudier sa régulation et son niveau de phosphorylation afin de de déterminer si cette régulation à la hausse est spécifique de l' α -synucléine ou ferait intervenir d'autres protéines clés de la MP.

Dans la deuxième partie de thèse, nous nous sommes intéressés à l'expression et à la régulation de la protéine Tau dans le système nerveux entérique en conditions physiologiques et pathologiques.

Nous avons identifié 1N3R et 0N4R comme étant les deux isoformes principales de Tau exprimées dans le SNE humain. Nous avons également observé l'expression de quatre isoformes de Tau dans la culture primaire de SNE de rat, contrastant avec l'expression prédominante de l'isoforme fœtale de Tau 0N3R dans les cultures primaires de neurones corticaux de rat. Le SNE et le SNC contiennent tous les deux des réseaux nerveux intégrés complexes et leurs similitudes, incluant leurs neurones et leurs cellules gliales sur le plan morphologique, ont incité à décrire le SNE comme étant « le deuxième cerveau » (Gershon, 1999). Nos résultats actuels suggèrent que cette ressemblance anatomique ne s'étend pas au niveau moléculaire, bien que les conséquences fonctionnelles de cette différence restent toujours à déterminer. Dans le côlon humain, Tau est exprimée dans le PM et le PSM et est principalement localisée dans le compartiment axonal et somatique, ce qui est en accord avec les données de la littérature sur le SNC puisque Tau y est principalement exprimée dans les axones (Guo et al., 2017). Toutefois, en l'absence de marquage dapi, d'analyse au microscope confocal ou de fractionnement biochimique subcellulaire, nous ne pouvons pas exclure qu'une petite proportion de Tau entérique puisse également être nucléaire, comme elle a été décrite dans le cerveau humain et dans des lignées de cellules neuronales (Guo et al., 2017).

À l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, nous avons montré que Tau était phosphorylée dans le SNE, en conditions physiologiques, sur les résidus Ser202-Thr205 et Ser396-Ser404, reconnue par les anticorps PHF8 et PHF-13, respectivement. Tau est connue pour être phosphorylée sur ces sites en conditions physiologiques dans le SNC (Noble et al., 2013) et nous le retrouvons dans le SNE. La déphosphorylation de Tau dans des lysats de cerveau humain adulte entraîne classiquement une migration plus rapide des isoformes de Tau en SDS-PAGE permettant une séparation et une identification plus précise de ses six isoformes (Hanger et al., 2002). Nous avons donc utilisé la même approche dans des échantillons de SNE. Contrairement à ce qui est observé dans le cerveau humain adulte, le traitement par phosphatase lambda n'a que peu ou pas modifié la migration des bandes immunoréactives pour Tau, suggérant que la protéine Tau entérique n'a pas été efficacement déphosphorylée. Puisque nos observations ont montré que Tau était phosphorylée dans l'intestin, au moins sur les résidus Ser202-Thr205 et Ser396-Ser404, ceci soulève l'hypothèse que la protéine Tau dans SNE est résistante à la déphosphorylation. Cela pourrait être lié à des changements conformationnels se produisant en cas de phosphorylation sur certains sites précis (Hanger et al., 2002). Par ailleurs, nous avons également montré que les isoformes de Tau présentes dans les cultures primaires de SNE étaient phosphorylées en condition basale et que leur niveau de phosphorylation pouvait être modulé. Les cultures de SNE pourraient donc être utilisées pour étudier la régulation de l'expression, de la phosphorylation et de la sécrétion de Tau, non seulement en conditions physiologiques mais également dans un contexte pathologique de neuropathie entérique.

Nous avons poursuivi l'étude en examinant l'expression de Tau entérique en conditions pathologiques. Nous n'avons observé aucune augmentation de la phosphorylation de Tau ni du ratio 4R/3R dans le côlon des patients atteints PSP. Ceci contraste fortement avec le fait que la PSP est considérée comme une tauopathie prototypique du SNC, caractérisée par une hyperphosphorylation, des formes tronquées et un déséquilibre du rapport 4R/3R (Ingelsson et al., 2007; Wray et al., 2008). Ceci suggère, à la différence de ce qui a été observé dans la MP, que le processus pathologique de la PSP est limité au SNC et n'implique pas le SNE. Une des limites de ce travail est que l'analyse est limitée au PSM, le PM n'étant pas accessible par biopsies classiques réalisées en endoscopie. Nous ne pouvons donc pas exclure l'existence de changements pathologiques de Tau dans le PM. Le perfectionnement de nouvelles procédures endoscopiques, comme les biopsies de pleine épaisseur (Neunlist et al., 2011), qui donnent accès aux deux plexus, pourrait aider à répondre à ces questions critiques. Toutefois, l'étude de Dugger et al. tend à confirmer nos résultats, en n'observant aucune augmentation de la phosphorylation de Tau sur deux sites dans le côlon au cours de la MA, la PSP ou la DCB. Les limitations de leur étude résident dans le fait qu'ils ont observé l'absence ou la présence de la phosphorylation de Tau sur seulement deux sites et n'ont pas quantifié leur expression dans les différentes tauopathies, ni examiné la présence de PHF. Ainsi, aucune de nos études ne peut formellement statuer sur l'absence de neuropathie entérique au cours des tauopathies, même si nous mettons en évidence, dans les PSP, une absence de formes pathologiques dans les neurones de la sous-muqueuse. Il serait tout de même intéressant de reproduire notre analyse, mais cette fois-ci dans des biopsies de patients MA, car si l'on prend l'exemple des synucléinopathies, les patients atteints d'AMS ou de DCL ne manifestent pas de pathologie entérique tandis que de nombreuses atteintes sont retrouvées au cours de la MP. Ainsi les patients PSP ne semblent pas présenter d'atteinte du SNE mais nous ne pouvons exclure un tel scénario dans d'autres tauopathies. De plus, il serait également intéressant d'examiner la présence ou non d'inflammation intestinale au cours des différentes tauopathies.

Dans notre dernière étude (article non soumis mais en cours d'écriture) nous avons voulu faire le parallèle entre la neuroinflammation et l'inflammation intestinale, et étudier la régulation de Tau entérique en conditions inflammatoires. En effet, il est maintenant reconnu que la neuroinflammation influence la phosphorylation de Tau, participe à la déstabilisation des microtubules et à l'agrégation de Tau et nous nous sommes demandé si les mêmes mécanismes pouvaient être retrouvés dans le SNE.

Nous avons observé une augmentation de l'expression des deux isoformes principales 1N3R et 0N4R dans des biopsies coliques de patients Crohn uniquement en zone inflammée comparés aux zones non inflammées et aux témoins, suggérant que cette régulation à la hausse est étroitement liée aux médiateurs pro-inflammatoires libérés au cours de la MC. Chez les patients Crohn, la réponse inflammatoire est de type Th1, caractérisée par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ , l'IL-12 et l'IL-1 β mais également des médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines (PGE2, PGI2, ...) (Christophi et al., 2012). Il serait intéressant de valider cette hypothèse

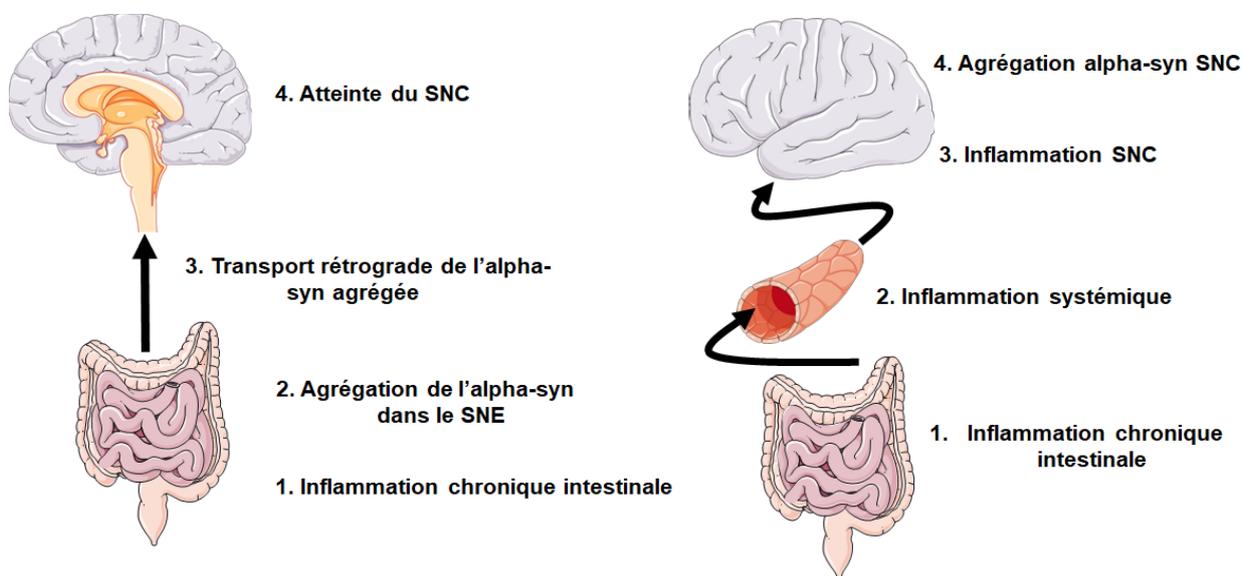
en examinant, *in vitro* dans des cultures primaires de SNE, si ces médiateurs peuvent réguler Tau, et d'analyser les voies de signalisation impliquées. De façon surprenante, nous n'avons observé aucune régulation de deux autres marqueurs neuronaux : MAP2c, dont la séquence peptidique est proche de celle de Tau, et β III tubuline, suggérant que cette régulation à la hausse est spécifique de Tau et de l' α -synucléine. Cependant, en normalisant par rapport à Tau totale, nous constatons que la régulation à la hausse de Tau n'est pas accompagnée d'une hyperphosphorylation sur son résidu S396 (PHF13). L'hyperphosphorylation de Tau altère ses fonctions physiologiques et favorise son agrégation en PHF (Drewes et al., 1995). Nous ne pouvons pas encore exclure le rôle de la phosphorylation Tau sur ses fonctions physiologiques au cours de l'inflammation chronique intestinale et il serait nécessaire d'étudier d'autres sites majeurs de phosphorylation afin d'étoffer nos résultats. Les formes tronquées de Tau sont présentes dans les dégénérescences neurofibrillaires observées au cours de la PSP et la MA (Newman et al. 2005). Afin de déterminer si la protéine tau est tronquée en C-terminal dans les neurones entériques de la MC, nous avons utilisé un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement la protéine tau clivée en Asp421. En normalisant par rapport la quantité totale de Tau, nous observons une diminution des formes tronquées de Tau, suggérant une absence de forme pathologique de Tau liée à sa troncation dans la MC. Nous avons poursuivi l'analyse des possibles formes pathologiques de Tau en examinant les agrégats. L'anticorps T22 est un anticorps validé qui reconnaît spécifiquement les formes oligomériques de Tau. Dans les lysats de cerveau MA, nous retrouvons des smears de plus haut poids moléculaire, spécifiques des formes oligomériques ou agrégées, cependant, nous ne détectons aucune de ces formes dans le côlon inflammé de patients MC comparés aux témoins. Les formes insolubles de Tau sont également retrouvées dans les DNF. Par ultracentrifugation, nous avons isolé les fractions solubles et insolubles de Tau mais n'avons observé aucune forme insoluble de Tau chez les MC. Ainsi, l'absence d'une hyperphosphorylation, de formes oligomériques, tronquées ou insolubles, nous laisse penser que la régulation à la hausse de Tau n'est pas accompagnée de formes pathologiques au cours de la MC. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette régulation, nous avons analysé le taux de transcrite et avons mis en évidence, tout comme pour l' α -synucléine, que MAPT est significativement diminué dans le côlon inflammé de patients MC, suggérant que cette régulation à la hausse ne serait pas liée à un mécanisme transcriptionnel mais serait due à une diminution ou une absence de dégradation de Tau. La dégradation des protéines s'effectue par deux voies principales, la voie de l'autophagie et la voie de l'ubiquitine protéasome (UPS). Nous avons rencontré quelques difficultés à immunoprécipiter les formes ubiquitinylées de Tau, cependant, en regardant le pattern global de l'ubiquitine par Western Blot, nous observons une augmentation de l'ubiquitinylation de la plupart des protéines en zone inflammée comparées aux zones saines et témoins, suggérant que l'activité UPS n'est pas altérée. L'inhibition *in vitro*, en culture primaire de SNE, du protéasome par l'inhibiteur MG132 entraîne une forte diminution de l'expression de Tau, suggérant que son inhibition n'est pas impliquée dans la régulation à la hausse de Tau. Une étude récente a montré que le facteur de transcription NRF2 fait décroître l'expression de Tau

en activant la protéine NDP52 (Jo et al., 2014). Nous avons montré que ces deux protéines étaient significativement diminuées en zone inflammée chez les patients atteints de la MC comparés aux témoins. De plus, l'activation *in vitro* de NRF2 entraîne une diminution significative de Tau, suggérant que son inhibition serait impliquée dans la régulation à la hausse de Tau chez les patients Crohn.

En résumé, nous avons caractérisé, chez l'homme et le rongeur, les isoformes de Tau dans le SNE en conditions physiologiques et au cours de tauopathies. Nous avons identifié 1N3R et 0N4R comme étant les deux isoformes principales de Tau exprimées dans le SNE humain, et quatre isoformes de Tau dans la culture primaire de SNE de rat. De plus, nous montrons des différences de susceptibilité de la protéine Tau à être déphosphorylée entre le SNC et le SNE. Toutefois, dans le côlon de patients PSP, nous n'observons pas de formes pathologiques de Tau, suggérant, à la différence de ce qui a été observé au cours de la MP, que le processus pathologique de la PSP est limité au SNC et n'impliquerait pas le SNE. Cependant, nous montrons, *in vivo*, que l'inflammation chronique intestinale régule à la hausse la protéine Tau, via une voie NRF2/NDP52 dépendante, mais que cette régulation n'est pas accompagnée de formes pathologiques de Tau. Tout comme pour l' α -synucléine, il serait ainsi intéressant de reproduire ces expérimentations dans des biopsies de patients plus âgés et ayant une inflammation chronique qui perdure depuis plusieurs années. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'analyser les conséquences fonctionnelles de cette altération de régulation de Tau au cours des MICI.

IV. Conclusion

Nos travaux caractérisent pour la première fois la régulation de deux protéines neuronales clés des synucléinopathies et tauopathies au cours de l'inflammation intestinale. Nous avons montré, *in vitro* et *in vivo*, qu'une inflammation aiguë régule à la baisse l' α -synucléine via une voie p38 dépendante et que cette régulation est spécifique des neurones entériques. En revanche, l'inflammation chronique intestinale régule à la hausse l' α -synucléine dans des biopsies de patients atteints de MC. Cette régulation ne semble pas faire intervenir un mécanisme transcriptionnel mais serait due à une absence de dégradation par la voie NRF2/NDP52. Cependant, cette augmentation d'expression n'est pas accompagnée de formes agrégées de l' α -synucléine. Toutefois, les patients inclus dans cette étude ont une moyenne d'âge de 33 ans et ont une MC depuis moins de 10 ans, ainsi nous ne pouvons pas exclure la survenue d'agrégats dans 15 à 20 ans chez ces patients. Ainsi, notre hypothèse de départ selon laquelle l'inflammation chronique entraînerait une régulation à la hausse et une agrégation de l' α -synucléine puis son transport rétrograde le long du nerf vague est toujours envisageable. Une deuxième hypothèse soulevée impliquerait qu'une inflammation systémique mènerait à la fois à une inflammation digestive et centrale, et que l'agrégation de l' α -synucléine se ferait dans le SNC et le SNE. Il serait intéressant de déterminer, au cours de la MP, si l'inflammation digestive arrive en premier lieu ou s'il s'agit de la neuroinflammation.



Parallèlement, nous avons identifié 1N3R et 0N4R comme étant les deux isoformes principales de Tau exprimées dans le SNE humain. Au cours de tauopathies, nous n'avons observé aucune augmentation de la phosphorylation de Tau ni du ratio 4R/3R dans le côlon des patients atteints de PSP, suggérant, à la différence de ce qui a été observé au cours de la MP, que le processus pathologique de la PSP est limité au SNC et n'impliquerait pas le SNE. Toutefois, l'inflammation chronique intestinale régule à la hausse la

protéine Tau, via une voie NRF2/NDP52 dépendante, en l'absence de formes pathologiques de Tau. Nous n'avons pas observé, au cours de tauopathies, la présence d'une neuropathie entérique, cependant, le scénario de tauopathies entériques au cours de MICI est envisageable. En effet, de nombreuses études observent une hyperplasie et une hypertrophie des fibres nerveuses dans les MICI et nous sommes la première équipe à montrer une dysrégulation de Tau au cours des MICI. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de cette régulation.



Neuropathologie et physiopathologie de la maladie de Parkinson : *focus* sur l' α -synucléine

Alice Prigent¹, Arthur Lionnet², Anne-Gaëlle Corbillé^{1,2,3}, Pascal Derkinderen^{1,2,3}

Disponible sur internet le :
28 décembre 2016

1. Inserm, U913, 44035 Nantes, France
2. CHU de Nantes, service de neurologie, boulevard Jacques-Monod, 44093 Nantes cedex 01, France
3. Université de Nantes, 44035 Nantes, France

Correspondance :

Pascal Derkinderen, CHU de Nantes, service de neurologie, boulevard Jacques-Monod, 44093 Nantes cedex 01, France.
derkinderenp@yahoo.fr, pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

■ Résumé

Les progrès réalisés en génétique, neurobiologie et neuropathologie ces 20 dernières années ont permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Il est désormais bien établi que l' α -synucléine, une protéine neuronale présynaptique, est non seulement un marqueur mais aussi un acteur de la maladie. Dans cette revue, nous discutons des avancées qui ont pu être obtenues en neuropathologie grâce à l'utilisation de l'immunohistochimie α -synucléine. Nous abordons ensuite le rôle de l' α -synucléine dans la diffusion du processus pathologique de la maladie de Parkinson.

■ Summary

Neuropathology and pathophysiology of Parkinson's disease: Focus on α -synuclein

The past 20 years has witnessed tremendous progress in our understanding of Parkinson's disease. It is now well established that α -synuclein, a presynaptic neuronal protein, is not only a marker but also an actor of the disease. In this review, we discuss the advances that have been obtained in neuropathology using α -synuclein immunohistochemistry and the role of this protein in the spread of the disease.

Les mécanismes moléculaires précis impliqués dans le mécanisme neurodégénératif et la diffusion du processus pathologique de la maladie de Parkinson ne sont qu'incomplètement compris. Toutefois, grâce aux avancées de la

génétique et de la biologie cellulaire, il est désormais établi qu'une protéine neuronale, l' α -synucléine, joue un rôle important dans le développement de la maladie. Cette protéine est en effet :

- le principal composant des corps et prolongements de Lewy, qui sont les inclusions intraneuronales caractéristiques de la maladie ;
- mutée dans des formes autosomiques dominantes de maladie de Parkinson ;
- capable d'être transmise de neurone à neurone par un mécanisme transsynaptique. Ce dernier aspect serait responsable de la diffusion du processus pathologique et de la progression de la maladie.

La maladie de Parkinson est une synucléinopathie

La maladie de Parkinson est classiquement caractérisée d'un point de vue anatomique par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire associée à la présence d'inclusions intracellulaires dans les neurones survivants, appelées corps et prolongements de Lewy [1]. Les corps de Lewy sont des inclusions d'une dizaine de microns de diamètre, à halo clair, présents dans le péricaryon alors que les prolongements de Lewy sont présents dans les prolongements neuronaux [2]. Bien que de multiples protéines soient présentes dans les corps de Lewy [2], l' α -synucléine, une protéine présynaptique, est un des composants majeur de ces inclusions [3]. La découverte de l' α -synucléine à partir de l'organe électrique du poisson torpille en 1988 est restée relativement confidentielle [4]. Il a fallu attendre la deuxième partie des années 1990 et l'identification d'une mutation du gène codant pour l' α -synucléine dans une famille atteinte d'une maladie de Parkinson de transmission autosomique dominante, pour que les neurologues, neurobiologistes et neuropathologistes s'intéressent à cette protéine [5]. Quelques mois après la mise en évidence de cette première forme monogénique de maladie de Parkinson, une équipe de Cambridge a montré que les corps et prolongements de Lewy de patients atteints de formes sporadiques de la maladie étaient fortement immunoréactifs pour l' α -synucléine [6,7]. L'immunohistochimie de l' α -synucléine est alors rapidement devenue la technique de référence pour la mise en évidence des corps et prolongements de Lewy, cette approche étant plus sensible que les techniques qui étaient utilisées auparavant qu'elles soient histochimiques (marquage hématine-éosine) ou immunohistochimiques (anticorps anti-ubiquitine) [8,9]. Des travaux ultérieurs ont montré que les inclusions intra-oligodendrocytaires caractéristiques de l'atrophie multisystématisée étaient elles aussi constituées d' α -synucléine [10]. La maladie de Parkinson, la maladie à corps de Lewy diffus et l'atrophie multisystématisée, caractérisées par des dépôts d' α -synucléine, sont des maladies neurodégénératives désormais regroupées sous le terme de « synucléinopathies » [11].

L' α -synucléine se propage de neurone à neurone

De nombreux travaux se sont intéressés au rôle de l' α -synucléine dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Les

premières données expérimentales se sont concentrées sur l' α -synucléine intracellulaire et ont montré que cette protéine a une capacité naturelle à s'agréger en structures amyloïdes grâce à son domaine central selon la progression suivante : dimères, oligomères, protofibrilles et fibrilles puis enfin corps de Lewy (revue dans [12]). Bien que l' α -synucléine ait été initialement considérée comme une protéine purement intracellulaire, la présence de la protéine dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma [13,14] a logiquement conduit certains groupes à étudier si elle pouvait être sécrétée. Plusieurs équipes indépendantes ont montré que l' α -synucléine était en effet sécrétée puisque mise en évidence dans le milieu de culture de neurones de système nerveux central et dans l'espace intercellulaire cérébral [15-17]. Cette sécrétion d' α -synucléine se produit dans les conditions physiologiques mais est plus importante en pathologie, par exemple lors d'un stress oxydant. L' α -synucléine libérée dans l'espace extracellulaire peut activer les cellules gliales en particulier microgliales et/ou être recaptée par les neurones voisins (revue dans [18]). Cette diffusion transsynaptique de neurones à neurones serait à l'origine de la diffusion du processus pathologique de la maladie de proche en proche, par un mécanisme de type *prion-like* (revue dans [19]). Elle expliquerait aussi la présence de corps de Lewy dans des neurones embryonnaires qui ont été transplantés 11 à 16 ans auparavant dans le striatum de patients parkinsoniens [20,21].

Le système nerveux central et les systèmes nerveux périphériques sont touchés par la synucléinopathie dans la maladie de Parkinson

Plusieurs laboratoires de neuropathologie ont réévalué, grâce aux techniques d'immunocytochimie de l' α -synucléine, la distribution de la pathologie de Lewy dans le système nerveux central mais aussi dans les systèmes nerveux périphériques [22-25]. Il a ainsi été montré qu'en dehors de la substance noire, certaines structures du système nerveux central comme le bulbe olfactif, le noyau dorsal moteur du vague, le complexe locus coeruleus-subcoeruleus, le noyau basal de Meynert et le faisceau intermédiaire-latéral de la moelle épinière sont touchés par le processus pathologique chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens [22,26] (figure 1). Il en va de même pour les systèmes nerveux autonomes périphériques comme l'innervation sympathique des glandes salivaires et le système nerveux entérique [25] (figures 2 et 3).

La présence d'inclusions d' α -synucléine dans de nombreuses structures en dehors de la substance noire pourrait fournir une explication neuropathologique aux signes non moteurs de la maladie. Ainsi, il est suggéré que l'atteinte du bulbe olfactif serait à l'origine de l'hyposmie qui est notée chez la quasi-totalité des patients et que l'atteinte du complexe locus coeruleus-subcoeruleus expliquerait les troubles de l'humeur ainsi que des troubles du comportement en sommeil paradoxal.

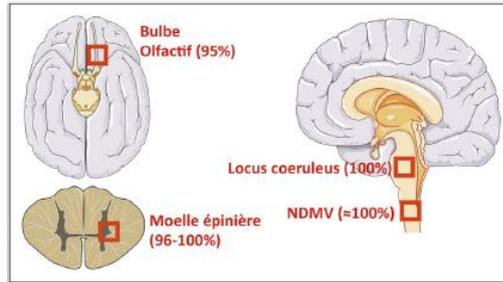


FIGURE 1

Régions du système nerveux central contenant des dépôts d' α -synucléine (en dehors de la substance noire). Seules les régions qui sont touchées chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens sont montrées (pourcentage d'atteinte entre parenthèse) ; NDMV : noyau dorsal moteur du vague

L'atteinte du faisceau intermédiaire-latéral de la moelle épinière serait responsable de l'hypotension orthostatique alors que l'atteinte combinée du noyau dorsal moteur du vague et du système nerveux entérique expliquerait les troubles de la motilité digestive (gastroparésie et constipation) (revue dans [27,28]) (tableau 1). Cette hypothèse physiopathologique bien que séduisante n'est toutefois pas complètement prouvée car elle repose essentiellement sur la distribution des inclusions d' α -synucléine et non sur l'existence d'une perte neuronale associée. Ceci est à prendre en considération car il est clairement démontré que la sévérité de l'akinésie et de l'hypertonie est inversement corrélée à la densité neuronale de la substance noire et non à la charge lésionnelle en corps de Lewy [29,30]. Une perte neuronale significative a été montrée pour le noyau basal de Meynert, le locus coeruleus ainsi que le noyau dorsal

moteur du vague par plusieurs études neuropathologiques indépendantes alors que des résultats contradictoires ont été obtenus pour le noyau olfactif antérieur [28]. Pour ce qui est du système nerveux entérique, il a été récemment montré qu'il n'y

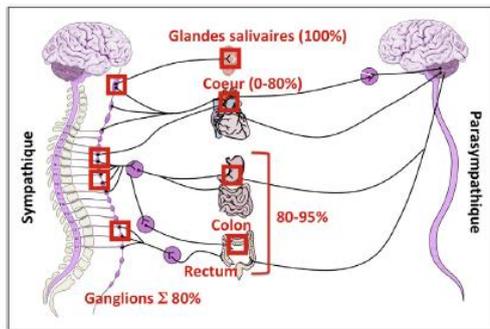


FIGURE 2

Régions du système nerveux autonome périphérique contenant des dépôts d' α -synucléine. Le pourcentage d'atteinte est entre parenthèse

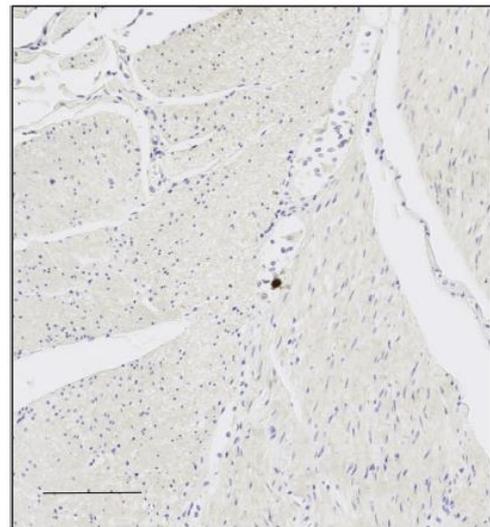


FIGURE 3

Détection des dépôts d' α -synucléine dans le colon sigmoïde d'un patient parkinsonien. Illustration d'immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre l' α -synucléine phosphorylée sur une coupe de tissu colique issue d'autopsie d'un patient parkinsonien. Noter la présence d' α -synucléine phosphorylée avec un aspect de corps de Lewy dans le plexus myentérique. Barre d'échelle 100 μ m.



- bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6469-73.
- [8] Lemox G, Lowe J, Morrell K, Landon M, Mayer RJ. Anti-ubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional techniques in the detection of diffuse Lewy body disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:67-71.
- [9] Kuzuhara S, Mori H, Izumiya M, Yoshimura M, Ihara Y. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* 1988;75:345-53.
- [10] Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, Yamada M, Toyoshima Y, Yoshimoto M, et al. Accumulation of alpha-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 1998;96:445-52.
- [11] Galvin JE, Lee VM, Trojanowski JQ. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol* 2001;58:186-90.
- [12] Waxman EA, Giasson BI. Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:616-24.
- [13] Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, et al. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 2000;287:65-7.
- [14] El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 2003;17:1945-7.
- [15] Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 2005;25:6016-24.
- [16] Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal. *J Neurosci* 2010;30:6838-51.
- [17] Emmanouilidou E, Elenis D, Papisilekas T, Stranjalis G, Gerozissis K, Ioannou PC, et al. Assessment of alpha-synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PLoS One* 2011;6:e22225.
- [18] Tyson T, Steiner JA, Brundin P. Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J Neurochem* 2016;(Suppl. 1):275-89.
- [19] Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 2010;9:1128-38.
- [20] Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008;14:501-3.
- [21] Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 2008;14:504-6.
- [22] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
- [23] 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.
- [24] Beach TG, White CL, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol* 2008;116:277-88.
- [25] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White LI, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2009;119:689-702.
- [26] Beach TG, White CL, Hladik CL, Sabbagh MN, Connor DJ, Shill HA, et al. Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2009;117:169-74.
- [27] Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, Frigerio R, et al. Neuropathology of non-motor features of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15 (Suppl 3):S1-5.
- [28] Adler CH, Beach TG. Neuropathological basis of nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.26605>.
- [29] Rinne JO, Rummukainen J, Paljärvi L, Sako E, Molsä P, Rinne UK. Neuronal loss in the substantia nigra in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease in relation to extrapyramidal symptoms and dementia. *Prog Clin Biol Res* 1989;317:325-32.
- [30] Greffard S, Vemy M, Bonnet A-M, Seilhean D, Hauw JJ, Duyckaerts C. A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol Aging* 2010;31:99-103.
- [31] 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.
- [32] Corbillé A-G, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P, Lebouvier T. Appraisal of the dopaminergic and noradrenergic innervation of the submucosal plexus in PD. *J Parkinsons Dis* 2014;4:571-6.
- [33] Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, Nguyen JM, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 2010;5:e12728.
- [34] Wolters E, Braak H. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm* 2006;70:309-19.
- [35] Dehay B, Bourdenx M, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, et al. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* 2015;14:855-66.

VI. Bibliographie

- Aamodt, E.J., and Williams, R.C. (1984). Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry* 23, 6023–6031.
- Aarsland, D., Pålhagen, S., Ballard, C.G., Ehrt, U., and Svenningsson, P. (2011). Depression in Parkinson disease—epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 35–47.
- 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.
- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* 24, 1082–1094.
- Ahlman, H., and Nilsson, O. (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann. Oncol.* 12, S63–S68.
- Akiyama, H., and McGeer, P.L. (1989). Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res.* 489, 247–253.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., and Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 300, G1054–G1064.
- Altschuler, S.M., Escardo, J., Lynn, R.B., and Miselis, R.R. (1993). The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology* 104, 502–509.
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., and van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129, 154–169.
- Ancolio, K., Alves da Costa, C., Uéda, K., and Checler, F. (2000). α -Synuclein and the Parkinson's disease-related mutant Ala53Thr- α -synuclein do not undergo proteasomal degradation in HEK293 and neuronal cells. *Neurosci. Lett.* 285, 79–82.
- Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., et al. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J. Biol. Chem.* 281, 29739–29752.
- Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human .tau. gene. *Biochemistry* 31, 10626–10633.
- Andreadis, A., Broderick, J.A., and Kosik, K.S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* 23, 3585–3593.
- 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.* 124, 665–680.
- Arendt, T., Stieler, J.T., and Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* 126, 238–292.
- Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G.R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1977–1982.
- Arrasate, M., Pérez, M., and Avila, J. (2000). Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem. Res.* 25, 43–50.
- Asi, Y.T., Simpson, J.E., Heath, P.R., Wharton, S.B., Lees, A.J., Revesz, T., Houlden, H., and Holton, J.L. (2014). Alpha-synuclein mRNA expression in oligodendrocytes in MSA. *Glia* 62, 964–970.

- 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.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 879–884.
- Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., and Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7849–7854.
- Bagheri, H., Damase-Michel, C., Lapeyre-Mestre, M., Cismondo, S., O'Connell, D., Senard, J.M., Rascol, O., and Montastruc, J.L. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* 22, 213–215.
- Balabanov, R., Strand, K., Goswami, R., McMahan, E., Begolka, W., Miller, S.D., and Popko, B. (2007). Interferon- γ -Oligodendrocyte Interactions in the Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neurosci.* 27, 2013–2024.
- Bär, K.J., Facer, P., Williams, N.S., Tam, P.K., and Anand, P. (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 112, 1381–1385.
- Barakat, R., and Redzic, Z. (2016). The Role of Activated Microglia and Resident Macrophages in the Neurovascular Unit during Cerebral Ischemia: Is the Jury Still Out? 3–14.
- 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.* 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.
- Bartels, T., Kim, N.C., Luth, E.S., and Selkoe, D.J. (2014). N-alpha-acetylation of α -synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation. *PLoS One* 9, e103727.
- Bas, J., Calopa, M., Mestre, M., Molleví, D.G., Cutillas, B., Ambrosio, S., and Buendia, E. (2001). Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J. Neuroimmunol.* 113, 146–152.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.
- Baumann, K., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Piwnicka-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* 336, 417–424.
- Bayliss, W.M., and Starling, E.H. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.*
- 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.* 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 α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 119, 689–702.
- Beach, T.G., Corbillé, A.-G., Letournel, F., Kordower, J.H., Kremer, T., Munoz, D.G., Intorcia, 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. Parkinsons. Dis.* *6*, 761–770.
- Becker, K., Kindrick, D., Relton, J., Harlan, J., and Winn, R. (2001). Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* *32*, 206–211.
- Bedarf, J.R., Hildebrand, F., Coelho, L.P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., Bork, P., and Wüllner, U. (2017). Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Med.* *9*, 39.
- Bellucci, A., Bugiani, O., Ghetti, B., and Spillantini, M.G. (2011). Presence of Reactive Microglia and Neuroinflammatory Mediators in a Case of Frontotemporal Dementia with P301S Mutation. *Neurodegener. Dis.* *8*, 221–229.
- Bencsik, A., Muselli, L., Leboidre, M., Lakhdar, L., and Baron, T. (2014). Early and persistent expression of phosphorylated α -synuclein in the enteric nervous system of A53T mutant human α -synuclein transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *73*, 1144–1151.
- Bennett, M.C., Bishop, J.F., Leng, Y., Chock, P.B., Chase, T.N., and Mouradian, M.M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J. Biol. Chem.* *274*, 33855–33858.
- Berardelli, A., Rothwell, J.C., Thompson, P.D., and Hallett, M. (2001). Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain* *124*, 2131–2146.
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E.-M. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5129–5134.
- von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (2001). Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local β -Structure. *J. Biol. Chem.* *276*, 48165–48174.
- Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., and Boudin, H. (2017). A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J. Physiol.* *595*, 583–598.
- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O.N., Cardona, A., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2010). Regulation of Tau Pathology by the Microglial Fractalkine Receptor. *Neuron* *68*, 19–31.
- Bialecka, M., Kurzawski, M., Klodowska-Duda, G., Opala, G., Juzwiak, S., Kurzawski, G., Tan, E.-K., and Drozdziak, M. (2007). CARD15 variants in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* *57*, 473–476.
- Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I., and Donato, R. (2007). S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 108–118.
- Blais, A., Aymard, P., and Lacour, B. (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflugers Arch.* *434*, 300–305.
- Blandini, F., Armentero, M.-T., and Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat. Disord.* *14 Suppl 2*, S124-9.
- Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., and Riederer, P. (1995). Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* *202*, 17–20.
- Bodner, R.A., Outeiro, T.F., Altmann, S., Maxwell, M.M., Cho, S.H., Hyman, B.T., McLean, P.J., Young, A.B., Housman, D.E., and Kazantsev, A.G. (2006). Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4246–

4251.

Bornstein, J.C., Costa, M., and Grider, J.R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol. Motil.* *16 Suppl 1*, 34–38.

Böttner, M., Zorenkov, D., Hellwig, I., Barrenschee, 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.

Böttner, M., Fricke, T., Müller, M., Barrenschee, M., Deuschl, G., Schneider, S.A., Egberts, J.-H., Becker, T., Fritscher-Ravens, A., Ellrichmann, M., et al. (2015). Alpha-synuclein is associated with the synaptic vesicle apparatus in the human and rat enteric nervous system. *Brain Res.* *1614*, 51–59.

Boudry, G., Morise, A., Seve, B., and Le Huërou-Luron, I. (2011). Effect of Milk Formula Protein Content on Intestinal Barrier Function in a Porcine Model of LBW Neonates. *Pediatr. Res.* *69*, 4–9.

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.

von Boyen, G.B.T. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* *53*, 222–228.

Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006a). Gastric α -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., de Vos, R.A.I., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006b). Gastric α -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., de Vos, R.A.I., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006c). 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.

Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.-H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., and Bethea, J.R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* *202*, 145–156.

Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V.I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S.R., and Bethea, J.R. (2009). Transgenic Inhibition of Astroglial NF- κ B Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation. *J. Immunol.* *182*, 2628–2640.

Brandt, R., and Lee, G. (1993). The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J. Neurochem.* *61*, 997–1005.

Brandt, R., Léger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* *131*, 1327–1340.

Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthaut, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.-M., et al. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 182–192.

Brodacki, B., Staszewski, J., Toczyłowska, B., Kozłowska, E., Drela, N., Chalimoniuk, M., and Stępien, A. (2008). Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci. Lett.* *441*, 158–162.

Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and van Noort, J.M. (2002). Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 1013–1021.

- Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *33*, 95–130.
- Buell, A.K., Galvagnion, C., Gaspar, R., Sparr, E., Vendruscolo, M., Knowles, T.P.J., Linse, S., and Dobson, C.M. (2014). Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7671–7676.
- Burre, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Sudhof, T.C. (2010). -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science (80-)*. *329*, 1663–1667.
- Burré, J. (2015). The Synaptic Function of α -Synuclein. *J. Parkinsons. Dis.* *5*, 699–713.
- 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–E6.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M. V (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* *93*, 189–201.
- Bussell, R., Ramlall, T.F., and Eliezer, D. (2005). Helix periodicity, topology, and dynamics of membrane-associated alpha-synuclein. *Protein Sci.* *14*, 862–872.
- Caceres, A., Payne, M.R., Binder, L.I., and Steward, O. (1983). Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 1738–1742.
- Cai, Z., Hussain, M.D., and Yan, L.-J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer’s disease. *Int. J. Neurosci.* *124*, 307–321.
- Camacho-Soto, A., Gross, A., Searles Nielsen, S., Dey, N., and Racette, B.A. (2018). Inflammatory bowel disease and risk of Parkinson’s disease in Medicare beneficiaries. *Parkinsonism Relat. Disord.* *50*, 23–28.
- Camero, S., Benítez, M.J., Barrantes, A., Ayuso, J.M., Cuadros, R., Ávila, J., and Jiménez, J.S. (2014). Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features which are Similar to those Found in Histone-DNA Complex. *J. Alzheimer’s Dis.* *39*, 649–660.
- Cannella, B., and Raine, C.S. (2004). Multiple sclerosis: Cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation. *Ann. Neurol.* *55*, 46–57.
- Carboni, E., and Lingor, P. (2015). Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson’s disease. *Metallomics* *7*, 395–404.
- Carlier, M.F., Simon, C., Cassoly, R., and Pradel, L.A. (1984). Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* *66*, 305–311.
- Cersosimo, M.G., and Benarroch, E.E. (2012). Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* *46*, 559–564.
- Chambonnière, M.L., Mosnier-Damet, M., and Mosnier, J.F. (2001). Expression of microtubule-associated protein tau by gastrointestinal stromal tumors. *Hum. Pathol.* *32*, 1166–1173.
- Chan, S.S.M., Chiu, H.F.K., Lam, L.C.W., and Leung, V.P.Y. (2002). Prevalence of dementia with Lewy bodies in an inpatient psychogeriatric population in Hong Kong Chinese. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* *17*, 847–850.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Südhof, T.C. (2003). A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. *J. Biol. Chem.* *278*, 15313–15318.
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M., and Südhof, T.C. (2005). α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration. *Cell* *123*, 383–396.
- Chandrasekharan, B., Bala, V., Kolachala, V.L., Vijay-Kumar, M., Jones, D., Gewirtz, A.T., Sitaraman, S. V., and Srinivasan, S. (2008). Targeted Deletion of Neuropeptide Y (NPY) Modulates Experimental Colitis. *PLoS*

One 3, e3304.

Chandrasekharan, B., Jeppsson, S., Pienkowski, S., Belsham, D.D., Sitaraman, S. V., Merlin, D., Kokkotou, E., Nusrat, A., Tansey, M.G., and Srinivasan, S. (2013). Tumor Necrosis Factor–Neuropeptide Y Cross Talk Regulates Inflammation, Epithelial Barrier Functions, and Colonic Motility. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 2535–2546.

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

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–677.

Chen, S.G., Stribinskis, V., Rane, M.J., Demuth, D.R., Gozal, E., Roberts, A.M., Jagadapillai, R., Liu, R., Choe, K., Shivakumar, B., et al. (2016). Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Rep.* 6, 34477.

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.

Choi, J.G., Kim, N., Ju, I.G., Eo, H., Lim, S.-M., Jang, S.-E., Kim, D.-H., and Oh, M.S. (2018). Oral administration of *Proteus mirabilis* damages dopaminergic neurons and motor functions in mice. *Sci. Rep.* 8, 1275.

Christophi, G.P., Rong, R., Holtzapple, P.G., Massa, P.T., and Landas, S.K. (2012). Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 2342–2356.

Chu, Y., and Kordower, J.H. (2007). Age-associated increases of α -synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol. Dis.* 25, 134–149.

Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151–7160.

Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., and Cuomo, R. (2011). Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, e372-82.

Civiero, L., Cogo, S., Biosa, A., and Greggio, E. (2018). The role of LRRK2 in cytoskeletal dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 1653–1663.

Clairembault, T., Kamphuis, W., Leclair-Visonneau, L., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Hol, E.M., and Derkinderen, P. (2014). Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 130, 805–815.

Clairembault, T., Leclair-Visonneau, L., Coron, E., Bourreille, A., Le Dily, S., Vavasseur, F., Heymann, M.-F., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2015). Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 12.

Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21, 249–254.

Clerc, N., and Furness, J.B. (2004). Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 24–27.

Clough, R.L., and Stefanis, L. (2007). A novel pathway for transcriptional regulation of α -synuclein. *FASEB J.* 21, 596–607.

Comella, C.L. (2007). Sleep disorders in Parkinson's disease: An overview. *Mov. Disord.* 22, S367–S373.

- Conlin, V.S., Wu, X., Nguyen, C., Dai, C., Vallance, B.A., Buchan, A.M.J., Boyer, L., and Jacobson, K. (2009). Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *297*, G735-50.
- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* *4*, 1318–1320.
- Cook, R.D., and Burnstock, G. (1976). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J. Neurocytol.* *5*, 195–206.
- Cooke, H.J. (2000). Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *915*, 77–80.
- Cookson, M.R. (2012). Cellular effects of LRRK2 mutations. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1070–1073.
- Corbillé, A.-G., Coron, E., Neunlist, M., Derkinderen, P., and Lebouvier, T. (2014). Appraisal of the dopaminergic and noradrenergic innervation of the submucosal plexus in PD. *J. Parkinsons. Dis.* *4*, 571–576.
- 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, F., Mumolo, M.G., Ceccarelli, L., Bellini, M., Romano, M.R., Sterpi, C., Ricchiuti, A., Marchi, S., and Bottai, M. (2005). Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* *54*, 364–368.
- Couch, Y., Alvarez-Erviti, L., Sibson, N.R., Wood, M.J., and Anthony, D.C. (2011). The acute inflammatory response to intranigral α -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J. Neuroinflammation* *8*, 166.
- Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 701–712.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* (80-.). *305*, 1292–1295.
- Dalfó, E., Gómez-Isla, T., Rosa, J.L., Bodelón, M.N., Tejedor, M.C., Barrachina, M., Ambrosio, S., and Ferrer, I. (2004). Abnormal α -Synuclein Interactions with Rab Proteins in α -Synuclein A30P Transgenic Mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 302–313.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., and Javoy-Agid, F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* *52*, 1–6.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. *Brain* *122*, 1437–1448.
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.-C., Goodchild, R., Larsen, K.E., Staal, R., Tieu, K., Schmitz, Y., Yuan, C.A., et al. (2002). Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 14524–14529.
- 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.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* *6*, 204.
- Delacourte, A., and Buée, L. (1997). Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int. Rev. Cytol.* *171*, 167–224.
- Derkinderen, P., Scales, T.M.E., Hanger, D.P., Leung, K.-Y., Byers, H.L., Ward, M.A., Lenz, C., Price, C., Bird,

- I.N., Perera, T., et al. (2005). Tyrosine 394 Is Phosphorylated in Alzheimer's Paired Helical Filament Tau and in Fetal Tau with c-Abl as the Candidate Tyrosine Kinase. *J. Neurosci.* *25*, 6584–6593.
- 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.
- Devos, D., Lebouvier, T., Lardeux, B., Biraud, M., Rouaud, T., Pouclet, H., Coron, E., Bruley des Varannes, S., Naveilhan, P., Nguyen, J.-M., et al. (2013). Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* *50*, 42–48.
- Dickson, D.W., Lin, W., Liu, W.K., and Yen, S.H. (1999). Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy. *Brain Pathol.* *9*, 721–732.
- Dignass, A.U., Becker, A., Spiegler, S., and Goebell, H. (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* *28*, 554–561.
- Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J. Physiol.* *595*, 489–503.
- DiSabato, D.J., Quan, N., and Godbout, J.P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem.* *139*, 136–153.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 20–32.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* *36*, 180–190.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (1995). Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity-regulating Kinase (p110^{mark}). *J. Biol. Chem.* *270*, 7679–7688.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* *89*, 297–308.
- Dubois, B., Danzé, F., Pillon, B., Cusimano, G., Lhermitte, F., and Agid, Y. (1987). Cholinergic-dependent cognitive deficits in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *22*, 26–30.
- Dubow, J.S. (2007). Autonomic Dysfunction in Parkinson's Disease. *Disease-a-Month* *53*, 265–274.
- Dugger, B.N., Whiteside, C.M., Maarouf, C.L., Walker, D.G., Beach, T.G., Sue, L.I., Garcia, A., Dunckley, T., Meechoovet, B., Reiman, E.M., et al. (2016). The Presence of Select Tau Species in Human Peripheral Tissues and Their Relation to Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* *51*, 345–356.
- Dugger, B.N., Hoffman, B.R., Scroggins, A., Serrano, G.E., Adler, C.H., Shill, H.A., Belden, C.M., Sabbagh, M.N., Caviness, J.N., Driver Dunckley, E., et al. (2019). Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neurosci. Lett.* *696*, 132–139.
- Dzamko, N., and Halliday, G.M. (2012). An emerging role for LRRK2 in the immune system. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1134–1139.
- D'Haens, G., Ferrante, M., Vermeire, S., Baert, F., Noman, M., Moortgat, L., Geens, P., Iwens, D., Aerden, I., Van Assche, G., et al. (2012). Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 2218–2224.
- Economou, M., Trikalinos, T.A., Loizou, K.T., Tsianos, E. V., and Ioannidis, J.P.A. (2004). Differential Effects of NOD2 Variants on Crohn's Disease Risk and Phenotype in Diverse Populations: A Metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 2393–2404.
- Edwards, L., Quigley, E.M.M., Hofman, R., and Pfeiffer, R.F. (1993). Gastrointestinal symptoms in

parkinson disease: 18-month follow-up study. *Mov. Disord.* 8, 83–86.

Eichele, D.D., and Kharbanda, K.K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 23, 6016–6029.

Eisensehr, I., Linke, R., Noachtar, S., Schwarz, J., Gildehaus, F.J., and Tatsch, K. (2000). Reduced striatal dopamine transporters in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Brain* 123, 1155–1160.

Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., and Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J. Inflamm. Res.* 7, 113–120.

Fanciulli, A., and Wenning, G.K. (2015). Multiple-System Atrophy. *N. Engl. J. Med.* 372.

Farack, U.M., Reiter, J., Gross, M., Moroder, L., Wünsch, E., and Loeschke, K. (1987). Influence of vasoactive intestinal peptide, secretin, and Ala4, Val5-secretin on the net movements of electrolytes, fluid, and mucus in the rat colon in vivo. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 139, 32–36.

Fares, M.-B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M.K., Jovi i, A., Kiely, A., Holton, J.L., Lee, S.-J., Gitler, A.D., Eliezer, D., et al. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4491–4509.

Fernández-Botrán, R., Ahmed, Z., Crespo, F.A., Gatenbee, C., Gonzalez, J., Dickson, D.W., and Litvan, I. (2011). Cytokine expression and microglial activation in progressive supranuclear palsy. *Parkinsonism Relat. Disord.* 17, 683–688.

Fillit, H., Ding, W.H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., and Wolf-Klein, G. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 129, 318–320.

Follett, P.L., Deng, W., Dai, W., Talos, D.M., Massillon, L.J., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Jensen, F.E. (2004). Glutamate Receptor-Mediated Oligodendrocyte Toxicity in Periventricular Leukomalacia: A Protective Role for Topiramate. *J. Neurosci.* 24, 4412–4420.

Forman, M.S., Lal, D., Zhang, B., Dabir, D. V., Swanson, E., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2005). Transgenic Mouse Model of Tau Pathology in Astrocytes Leading to Nervous System Degeneration. *J. Neurosci.* 25, 3539–3550.

Forsyth, C.B., Shannon, K.M., Kordower, J.H., Voigt, R.M., Shaikh, M., Jaglin, J.A., Estes, J.D., Dodiya, H.B., and Keshavarzian, A. (2011). Increased Intestinal Permeability Correlates with Sigmoid Mucosa α -Synuclein Staining and Endotoxin Exposure Markers in Early Parkinson's Disease. *PLoS One* 6, e28032.

Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 122–132.

Frolkis, A., Dieleman, L.A., Barkema, H.W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R.N., Madsen, K., Kaplan, G.G., and on behalf of the Alberta IBD Consortium (2013). Environment and the Inflammatory Bowel Diseases. *Can. J. Gastroenterol.* 27, e18–e24.

Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A.S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K.-A., et al. (2013). Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte–Neuron Communication. *PLoS Biol.* 11, e1001604.

Fujioka, S., Curry, S.E., Kennelly, K.D., Tacik, P., Heckman, M.G., Tsuboi, Y., Strongosky, A.J., van Gerpen, J.A., Uitti, R.J., Ross, O.A., et al. (2017). Occurrence of Crohn's disease with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 37, 116–117.

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–

Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* *81*, 87–96.

Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 286–294.

Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* *72*, 143–164.

Furness, J.B., Callaghan, B.P., Rivera, L.R., and Cho, H.-J. (2014). The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 39–71.

Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* *28*, 12–18.

Galic, M.A., Riazi, K., and Pittman, Q.J. (2012). Cytokines and brain excitability. *Front. Neuroendocrinol.* *33*, 116–125.

Galligan, J.J., LePard, K.J., Schneider, D.A., and Zhou, X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* *81*, 97–103.

Galvin, J.E., Schuck, T.M., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2001). Differential Expression and Distribution of α -, β -, and γ -Synuclein in the Developing Human Substantia Nigra. *Exp. Neurol.* *168*, 347–355.

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.

Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B.E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J.R., Rioux, J.D., Daly, M.J., Xavier, R.J., et al. (2010). LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J. Immunol.* *185*, 5577–5585.

Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A.I., Dominguez-Meijide, A., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2018). Bidirectional Neural Interaction Between Central Dopaminergic and Gut Lesions in Parkinson's Disease Models. *Mol. Neurobiol.* *55*, 7297–7316.

Gaspar, P., Duyckaerts, C., Alvarez, C., Javoy-Agid, F., and Berger, B. (1991). Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *30*, 365–374.

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.* *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.

Georgieff, I.S., Liem, R.K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J., and Shelanski, M.L. (1993). Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J. Cell Sci.* *105 (Pt 3)*, 729–737.

Georgieva, E.R., Xiao, S., Borbat, P.P., Freed, J.H., and Eliezer, D. (2014). Tau Binds to Lipid Membrane Surfaces via Short Amphipathic Helices Located in Its Microtubule-Binding Repeats. *Biophys. J.* *107*, 1441–1452.

Gerfen, C.R., Miyachi, S., Paletzki, R., Brown, P., O'Connell, M., Ghetti, B., Gossage, H., Emson, P.C., Wilkinson, L.S., Goedert, M., et al. (2002). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J. Neurosci.* *22*, 5042–5054.

Gershon, M.D. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel

syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 39, S184-93.

Gershon, M.D. (1999). The enteric nervous system: a second brain. *Hosp. Pract.* (1995) 34, 31–32, 35–38, 41-2 passim.

Ghosh, D., Mondal, M., Mohite, G.M., Singh, P.K., Ranjan, P., Anoop, A., Ghosh, S., Jha, N.N., Kumar, A., and Maji, S.K. (2013). The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates α -Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry* 52, 6925–6927.

Ghosh, D., Sahay, S., Ranjan, P., Salot, S., Mohite, G.M., Singh, P.K., Dwivedi, S., Carvalho, E., Banerjee, R., Kumar, A., et al. (2014). The newly discovered Parkinson's disease associated Finnish mutation (A53E) attenuates α -synuclein aggregation and membrane binding. *Biochemistry* 53, 6419–6421.

Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I. V, Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985–989.

Giasson, B.I., Murray, I.V.J., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2001). A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 2380–2386.

Gilman, S., Wenning, G.K., Low, P.A., Brooks, D.J., Mathias, C.J., Trojanowski, J.Q., Wood, N.W., Colosimo, C., Durr, A., Fowler, C.J., et al. (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71, 670–676.

Giovannoni, G., van Schalkwyk, J., Fritz, V.U., and Lees, A.J. (1999). Bradykinesia akinesia inco-ordination test (BRAIN TEST): an objective computerised assessment of upper limb motor function. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67, 624–629.

Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225–4230.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989b). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393–399.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Crowther, R.A., Vanmechelen, E., Probst, I.-A., Gotz, J., Bi~irki, ~ K, Cohen, P., Probst, A., et al. (1995). Molecular Dissection of the Paired Helical Filament.

Goldman, J.G., and Postuma, R. (2014). Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 434–441.

Gomes, M.Z., Raisman-Vozari, R., and Del Bel, E.A. (2008). A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 1203, 160–169.

Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The Enteric Nervous System. *N. Engl. J. Med.* 334, 1106–1115.

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.* 29, 991–998.

Green, C.L., Ho, W., Sharkey, K.A., and McKay, D.M. (2004). Dextran sodium sulfate-induced colitis reveals nicotinic modulation of ion transport via iNOS-derived NO. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G706-14.

Greenbaum, E.A., Graves, C.L., Mishizen-Eberz, A.J., Lupoli, M.A., Lynch, D.R., Englander, S.W., Axelsen, P.H., and Giasson, B.I. (2005). The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J.*

Biol. Chem. 280, 7800–7807.

Greenwood, J., Heasman, S.J., Alvarez, J.I., Prat, A., Lyck, R., and Engelhardt, B. (2011). Review: Leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: A prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 24–39.

Greenwood, J.A., Scott, C.W., Spreen, R.C., Caputo, C.B., and Johnson, G. V (1994). Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J. Biol. Chem.* 269, 4373–4380.

Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A.-M., Seilhean, D., Hauw, J.-J., and Duyckaerts, C. (2010a). 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.

Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A.-M., Seilhean, D., Hauw, J.-J., and Duyckaerts, C. (2010b). 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.

Griffith, L.M., and Pollard, T.D. (1982). The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 9143–9151.

Gross, E.R., Gershon, M.D., Margolis, K.G., Gertsberg, Z. V, Li, Z., and Cowles, R.A. (2012). Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology* 143, 408-17.e2.

Gu, Y., Oyama, F., and Ihara, Y. (2002). τ Is Widely Expressed in Rat Tissues. *J. Neurochem.* 67, 1235–1244.

Guo, T., Noble, W., and Hanger, D.P. (2017a). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 133, 665–704.

Guo, T., Noble, W., and Hanger, D.P. (2017b). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 133, 665–704.

Haehner, A., Boesveldt, S., Berendse, H.W., Mackay-Sim, A., Fleischmann, J., Silburn, P.A., Johnston, A.N., Mellick, G.D., Herting, B., Reichmann, H., et al. (2009). Prevalence of smell loss in Parkinson's disease – A multicenter study. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 490–494.

Hällgren, A., Flemström, G., and Nylander, O. (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am. J. Physiol.* 275, G95-103.

Hamby, M.E., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2006). TGF- β 1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia* 54, 566–577.

Hanauer, S.B. (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12 Suppl 1, S3-9.

Hancock, L., and Mortensen, N.J. (2008). How often do IBD patients require resection of their intestine? *Inflamm. Bowel Dis.* 14, S68–S69.

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., and Anderton, B.H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147, 58–62.

Hanger, D.P., Gibb, G.M., de Silva, R., Boutajangout, A., Brion, J.-P., Revesz, T., Lees, A.J., and Anderton, B.H. (2002). The complex relationship between soluble and insoluble tau in tauopathies revealed by efficient dephosphorylation and specific antibodies. *FEBS Lett.* 531, 538–542.

Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 15, 112–119.

Hansen, M.B. (2003a). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.

- Hansen, M.B. (2003b). The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol. Toxicol.* *92*, 249–257.
- Hardoff, R., Sula, M., Tamir, A., Soil, A., Front, A., Badarna, S., Honigman, S., and Giladi, N. (2001). Gastric emptying time and gastric motility in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *16*, 1041–1047.
- Harms, A.S., Delic, V., Thome, A.D., Bryant, N., Liu, Z., Chandra, S., Jurkuvenaite, A., and West, A.B. (2017). α -Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. *Acta Neuropathol. Commun.* *5*, 85.
- He, Y., Appel, S., and Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res.* *909*, 187–193.
- Heidebrink, J.L. (2002). Is Dementia with Lewy Bodies the Second Most Common Cause of Dementia? *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* *15*, 182–187.
- Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-Döring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., Trenkwalder, C., Oertel, W.H., Mollenhauer, B., and Wilmes, P. (2018). The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov. Disord.* *33*, 88–98.
- Hely, M.A., Reid, W.G.J., Adena, M.A., Halliday, G.M., and Morris, J.G.L. (2008). The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. *Mov. Disord.* *23*, 837–844.
- Higashi, S., Moore, D.J., Yamamoto, R., Minegishi, M., Sato, K., Togo, T., Katsuse, O., Uchikado, H., Furukawa, Y., Hino, H., et al. (2009). Abnormal Localization of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 to the Endosomal-Lysosomal Compartment in Lewy Body Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *68*, 994–1005.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 1381–1388.
- Hirai, Y., Fujita, S.C., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. (2004). Phosphorylated α -synuclein in normal mouse brain. *FEBS Lett.* *572*, 227–232.
- Hirsch, E.C., Vyas, S., and Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *18 Suppl 1*, S210-2.
- Hoehner, J.C., Wester, T., Pålman, S., and Olsen, L. (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* *110*, 756–767.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* *509*, 356–371.
- Hol, E.M., and Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* *32*, 121–130.
- Holdorff, B. (2006). Fritz Heinrich Lewy (1885–1950). *J. Neurol.* *253*, 677–678.
- Hooper, L. V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., and Gordon, J.I. (2001). Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science (80-)*. *291*, 881–884.
- Houser, M.C., Chang, J., Factor, S.A., Molho, E.S., Zabetian, C.P., Hill-Burns, E.M., Payami, H., Hertzberg, V.S., and Tansey, M.G. (2018). Stool Immune Profiles Evince Gastrointestinal Inflammation in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* *33*, 793–804.
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 599–603.
- Hui, K.Y., Fernandez-Hernandez, H., Hu, J., Schaffner, A., Pankratz, N., Hsu, N.-Y., Chuang, L.-S., Carmi, S.,

- Villaverde, N., Li, X., et al. (2018). Functional variants in the LRRK2 gene confer shared effects on risk for Crohn's disease and Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* *10*, eaai7795.
- Huizinga, J.D., and Lammers, W.J.E.P. (2009). Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *296*, G1-8.
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debré, P., Agid, Y., Dugas, B., and Hirsch, E.C. (1999). FcεRII/CD23 Is Expressed in Parkinson's Disease and Induces, In Vitro, Production of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-α in Glial Cells. *J. Neurosci.* *19*, 3440–3447.
- Hwang, S.C., Jhon, D.Y., Bae, Y.S., Kim, J.H., and Rhee, S.G. (1996). Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* *271*, 18342–18349.
- Ibáñez, P., Bonnet, A.-M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Dürr, A., and Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet (London, England)* *364*, 1169–1171.
- Ibiza, S., García-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misic, A.M., Bartow-McKenney, C., Larson, D.M., Pavan, W.J., et al. (2016). Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* *535*, 440–443.
- Ii, K., ITO, H., TANAKA, K., and HIRANO, A. (1997). Immunocytochemical Co-localization of the Proteasome in Ubiquitinated Structures in Neurodegenerative Diseases and the Elderly. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *56*, 125–131.
- Ingelsson, M., Ramasamy, K., Russ, C., Freeman, S.H., Orne, J., Raju, S., Matsui, T., Growdon, J.H., Frosch, M.P., Ghetti, B., et al. (2007). Increase in the relative expression of tau with four microtubule binding repeat regions in frontotemporal lobar degeneration and progressive supranuclear palsy brains. *114*, 471–479.
- Irwin, D.J., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2013). Parkinson's disease dementia: convergence of α-synuclein, tau and amyloid-β pathologies. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 626–636.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* *14*, 467–475.
- Jain, S., and Goldstein, D.S. (2012). Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: From pathophysiology to pathogenesis. *Neurobiol. Dis.* *46*, 572–580.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Reddy, D.N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* *21*, 8787.
- Janelins, M.C., Mastrangelo, M.A., Park, K.M., Sudol, K.L., Narrow, W.C., Oddo, S., LaFerla, F.M., Callahan, L.M., Federoff, H.J., and Bowers, W.J. (2008). Chronic Neuron-Specific Tumor Necrosis Factor-Alpha Expression Enhances the Local Inflammatory Environment Ultimately Leading to Neuronal Death in 3xTg-AD Mice. *Am. J. Pathol.* *173*, 1768–1782.
- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L.M., Li, N., von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M.A., Liu, S., Glanz, B.L., et al. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* *7*, 12015.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *79*, 368–376.
- Jellinger, K.A. (2014). Neuropathology of multiple system atrophy: New thoughts about pathogenesis. *Mov. Disord.* *29*, 1720–1741.
- Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1861–1867.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci.* *3*, 2206–2218.

- Jicha, G.A., O'Donnell, A., Weaver, C., Angeletti, R., and Davies, P. (1999). Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* *72*, 214–224.
- Jo, C., Gundemir, S., Pritchard, S., Jin, Y.N., Rahman, I., and Johnson, G.V.W. (2014). ARTICLE Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat. Commun.* *5*.
- Johnson, G. V (1992). Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J. Neurochem.* *59*, 2056–2062.
- Jost, W.H. (1997). Gastrointestinal Motility Problems in Patients with Parkinson's Disease. *Drugs Aging* *10*, 249–258.
- Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., van Der Putten, H., Probst, A., et al. (2000). Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J. Neurosci.* *20*, 6365–6373.
- 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 α -synuclein staging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *34*, 284–295.
- Kalf, J.G., de Swart, B.J.M., Bloem, B.R., and Munneke, M. (2012). Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson's disease: A meta-analysis. *Parkinsonism Relat. Disord.* *18*, 311–315.
- Kalia, L. V, and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* *386*, 896–912.
- Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L.H., and Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* *438*, 1162–1166.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 573–621.
- Kato, H., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Ohi, R., So, N., and Iwasaki, Y. (1990). Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* *25*, 514–519.
- Kehagia, A.A., Barker, R.A., and Robbins, T.W. (2010). Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* *9*, 1200–1213.
- Kelly, L.P., Carvey, P.M., Keshavarzian, A., Shannon, K.M., Shaikh, M., Bakay, R.A.E., and Kordower, J.H. (2014). Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *29*, 999–1009.
- Kermarrec, L., Durand, T., Neunlist, M., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2016). Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. *J. Neuroimmunol.* *295–296*, 79–83.
- Keshavarzian, A., Green, S.J., Engen, P.A., Voigt, R.M., Naqib, A., Forsyth, C.B., Mutlu, E., and Shannon, K.M. (2015). Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *30*, 1351–1360.
- KIDD, M. (1963). Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature* *197*, 192–193.
- Killinger, B.A., Madaj, Z., Sikora, J.W., Rey, N., Haas, A.J., Vepa, Y., Lindqvist, D., Chen, H., Thomas, P.M., Brundin, P., et al. (2018). The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* *10*, eaar5280.
- Kim, B., Yang, M.-S., Choi, D., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Seol, W., Choi, S., Jou, I., Kim, E.-Y., and Joe, E. (2012). Impaired Inflammatory Responses in Murine Lrrk2-Knockdown Brain Microglia. *PLoS One* *7*, e34693.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y.,

- and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.
- Klionsky, D.J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931–937.
- Kontopoulos, E., Parvin, J.D., and Feany, M.B. (2006). α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3012–3023.
- Köpke, E., Tung, Y.C., Shaikh, S., Alonso, A.C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 268, 24374–24384.
- KOSAKA, K. (2014). Lewy body disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 90, 301–306.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Binder, L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Lee, G. (1988). Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1, 817–825.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389–1397.
- Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M., and Novak, M. (2011). Misfolded Truncated Protein τ Induces Innate Immune Response via MAPK Pathway. *J. Immunol.* 187, 2732–2739.
- Kovacs, G.G. (2018). Tauopathies. In *Handbook of Clinical Neurology*, pp. 355–368.
- Ksiezak-Reding, H., Pyo, H.K., Feinstein, B., and Pasinetti, G.M. (2003). Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1639, 159–168.
- Kumar, A., Leinisch, F., Kadiiska, M.B., Corbett, J., and Mason, R.P. (2016). Formation and Implications of Alpha-Synuclein Radical in Maneb- and Paraquat-Induced Models of Parkinson’s Disease. *Mol. Neurobiol.* 53, 2983–2994.
- Kuo, Y.-M., Li, Z., Jiao, Y., Gaborit, N., Pani, A.K., Orrison, B.M., Bruneau, B.G., Giasson, B.I., Smeyne, R.J., Gershon, M.D., et al. (2010). Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated α -synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1633–1650.
- 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.
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G976-87.
- Lashuel, H.A., Petre, B.M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R.J., Walz, T., and Lansbury, P.T. (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson’s disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J. Mol. Biol.* 322, 1089–1102.
- Laurent, C., Buée, L., and Blum, D. (2018). Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer’s Disease and Tauopathies? 41.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Damier, P., Coron, E., Toucheffeu, Y., Vrignaud, S., Naveilhan, P., Galmiche, J.-P., Bruley des Varannes, S., Derkinderen, P., et al. (2008). Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson’s disease. *Gut* 57, 1741–1743.
- Lebouvier, T., Scales, T.M.E., Williamson, R., Noble, W., Duyckaerts, C., Hanger, D.P., Reynolds, C.H., Anderton, B.H., and Derkinderen, P. (2009). The Microtubule-Associated Protein Tau is Also

Phosphorylated on Tyrosine. *J. Alzheimer's Dis.* 18, 1–9.

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. (2010). Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms. *PLoS One* 5, e12728.

Lee, D.C., Rizer, J., Selenica, M.-L.B., Reid, P., Kraft, C., Johnson, A., Blair, L., Gordon, M.N., Dickey, C.A., and Morgan, D. (2010). LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. *J. Neuroinflammation* 7, 56.

Lee, G., Neve, R.L., and Kosik, K.S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2, 1615–1624.

Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 21), 3167–3177.

Lee, S., Imai, Y., Gehrke, S., Liu, S., and Lu, B. (2012). The synaptic function of LRRK2. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1047–1051.

Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D., and Hwang, D. (1992). Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267, 25934–25938.

Lelièvre, V., Meunier, A.C., Caigneaux, E., Falcon, J., and Muller, J.M. (1998). Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cell. Signal.* 10, 13–26.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., et al. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451–452.

Lesage, S., Dürr, A., Tazir, M., Lohmann, E., Leutenegger, A.-L., Janin, S., Pollak, P., and Brice, A. (2006). *LRRK2 G2019S* as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *N. Engl. J. Med.* 354, 422–423.

Lewis, G.P., and Fisher, S.K. (2003). Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int. Rev. Cytol.* 230, 263–290.

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

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.* 4, 309–315.

Li, X.-C., Hu, Y., Wang, Z., Luo, Y., Zhang, Y., Liu, X.-P., Feng, Q., Wang, Q., Ye, K., Liu, G.-P., et al. (2016). Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins. *Sci. Rep.* 6, 24756.

Li, Y., Liu, L., Barger, S.W., and Griffin, W.S.T. (2003). Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J. Neurosci.* 23, 1605–1611.

Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* 5, 1403–1409.

Lin, J.-C., Lin, C.-S., Hsu, C.-W., Lin, C.-L., and Kao, C.-H. (2016). Association Between Parkinson's Disease and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1049–1055.

Lin, T., Zhang, W., Fan, Y., and Mulholland, M. (2007). Interleukin-1beta and interleukin-6 stimulate matrix

metalloproteinase-9 secretion in cultured myenteric glia. *J. Surg. Res.* *137*, 38–45.

Lindersson, E., Beedholm, R., Højrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K.B., and Jensen, P.H. (2004). Proteasomal Inhibition by α -Synuclein Filaments and Oligomers. *J. Biol. Chem.* *279*, 12924–12934.

Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1942–1950.

Liu, Y., Qin, L., Wilson, B., Wu, X., Qian, L., Granholm, A.-C., Crews, F.T., and Hong, J.-S. (2008). Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits. *Neurotoxicology* *29*, 864–870.

Liu, Y.A., Chung, Y.C., Pan, S.T., Shen, M.Y., Hou, Y.C., Peng, S.J., Pasricha, P.J., and Tang, S.C. (2013). 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e324–38.

Liu, Z., Lee, J., Krummey, S., Lu, W., Cai, H., and Lenardo, M.J. (2011). The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat. Immunol.* *12*, 1063–1070.

Loftus, E. V., Schoenfeld, P., and Sandborn, W.J. (2002). The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *16*, 51–60.

Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 8422–8426.

Louveau, A., Harris, T.H., and Kipnis, J. (2015). Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol.* *36*, 569–577.

Ltic, S., Perovic, M., Mladenovic, A., Raicevic, N., Ruzdijic, S., Rakic, L., and Kanazir, S. (2004). Alpha-synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *J. Mol. Neurosci.* *22*, 199–204.

Lu, L., Neff, F., Alvarez-Fischer, D., Henze, C., Xie, Y., Oertel, W.H., Schlegel, J., and Hartmann, A. (2005). Gene expression profiling of Lewy body-bearing neurons in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* *195*, 27–39.

Lyman, M., Lloyd, D.G., Ji, X., Vizcaychipi, M.P., and Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci. Res.* *79*, 1–12.

Lyons, K.E., and Pahwa, R. (2011). The impact and management of nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Am. J. Manag. Care* *17 Suppl 12*, S308–14.

Macfarlane, S., and Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* *62*, 67–72.

Madine, J., Doig, A.J., and Middleton, D.A. (2006). A Study of the Regional Effects of α -Synuclein on the Organization and Stability of Phospholipid Bilayers [†]. *Biochemistry* *45*, 5783–5792.

Maeda, S., Hsu, L.-C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* *307*, 734–738.

Maltsev, A.S., Ying, J., and Bax, A. (2012). Impact of N-terminal acetylation of α -synuclein on its random coil and lipid binding properties. *Biochemistry* *51*, 5004–5013.

Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., and Di Monte, D.A. (2002). The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *277*, 1641–1644.

Marchiando, A.M., Graham, W.V., and Turner, J.R. (2010). Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *5*, 119–144.

- Maroteaux, L., Campanelli, J., and Scheller, R. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* *8*, 2804–2815.
- Marotta, N.P., Cherwien, C.A., Abeywardana, T., and Pratt, M.R. (2012). O-GlcNAc modification prevents peptide-dependent acceleration of α -synuclein aggregation. *Chembiochem* *13*, 2665–2670.
- Marras, C., Lang, A.E., Austin, P.C., Lau, C., and Urbach, D.R. (2016). Appendectomy in mid and later life and risk of Parkinson's disease: A population-based study. *Mov. Disord.* *31*, 1243–1247.
- Marsh, L. (2013). Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *13*, 409.
- Martinez-Martin, P., Schapira, A.H.V., Stocchi, F., Sethi, K., Odin, P., MacPhee, G., Brown, R.G., Naidu, Y., Clayton, L., Abe, K., et al. (2007). Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; Study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. *Mov. Disord.* *22*, 1623–1629.
- Martinez-Ramirez, D., Almeida, L., Giugni, J.C., Ahmed, B., Higuchi, M., Little, C.S., Chapman, J.P., Mignacca, C., Shukla, A.W., Hess, C.W., et al. (2015). Rate of aspiration pneumonia in hospitalized Parkinson's disease patients: a cross-sectional study. *BMC Neurol.* *15*, 104.
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., et al. (2008). Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.* *118*, 777–788.
- Mayo, M.C., and Bordelon, Y. (2014). Dementia with Lewy bodies. *Semin. Neurol.* *34*, 182–188.
- McCoy, M.K., Ruhn, K.A., Martinez, T.N., McAlpine, F.E., Blesch, A., and Tansey, M.G. (2008). Intranigral lentiviral delivery of dominant-negative TNF attenuates neurodegeneration and behavioral deficits in hemiparkinsonian rats. *Mol. Ther.* *16*, 1572–1579.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* *38*, 1285–1285.
- McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., and Doudet, D. (2003). Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann. Neurol.* *54*, 599–604.
- McGlinchey, R.P., and Lee, J.C. (2015). Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 9322–9327.
- McKeith, I.G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E.K., Dickson, D.W., Hansen, L.A., Salmon, D.P., Lowe, J., Mirra, S.S., Byrne, E.J., et al. (1996). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* *47*, 1113–1124.
- McNaught, K.S.P., and Olanow, C.W. (2003). Proteolytic stress: A unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *53*, S73–S86.
- McNaught, K.S.P., Mytilineou, C., Jnabaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jennert, P., and Olanow, C.W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* *81*, 301–306.
- McNaught, K.S.P., Perl, D.P., Brownell, A.-L., and Olanow, C.W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *56*, 149–162.
- McOmber, M.E., Ou, C.-N., and Shulman, R.J. (2010). Effects of Timing, Sex, and Age on Site-specific Gastrointestinal Permeability Testing in Children and Adults. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *50*, 269–275.
- Mendes, A., Gonçalves, A., Vila-Chã, N., Moreira, I., Fernandes, J., Damásio, J., Teixeira-Pinto, A., Taipa, R., Lima, A.B., and Cavaco, S. (2015). Appendectomy may delay Parkinson's disease Onset. *Mov. Disord.* *30*,

1404–1407.

- Meurette, G., Blanchard, C., Duchalais-Dassonneville, E., Coquenlorge, S., Aubert, P., Wong, M., Lehur, P.-A., and Neunlist, M. (2012). Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 267–e110.
- Miller, D.W., Johnson, J.M., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Standaert, D.G., and Young, A.B. (2005). Absence of α -synuclein mRNA expression in normal and multiple system atrophy oligodendroglia. *J. Neural Transm.* *112*, 1613–1624.
- Miyakawa, S., Ogino, M., Funabe, S., Uchino, A., Shimo, Y., Hattori, N., Ichinoe, M., Mikami, T., Saegusa, M., Nishiyama, K., et al. (2013). Lewy body pathology in a patient with a homozygous *Parkin* deletion. *Mov. Disord.* *28*, 388–391.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- Moehle, M.S., Webber, P.J., Tse, T., Sukar, N., Standaert, D.G., DeSilva, T.M., Cowell, R.M., and West, A.B. (2012). LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses. *J. Neurosci.* *32*, 1602–1611.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., and Nagatsu, T. (1994a). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* *180*, 147–150.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994b). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* *165*, 208–210.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994c). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* *165*, 208–210.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., and Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* *211*, 13–16.
- Mohan, R., and John, A. (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life* *67*, 395–403.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., and Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* *263*, 663–665.
- Morales, M., and Fifkova, E. (1989). Distribution of MAP2 in dendritic spines and its colocalization with actin. An immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res.* *256*, 447–456.
- Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K., and Mizuno, Y. (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* *51*, 890–892.
- Moro, F., Levenez, F., Durual, S., Plaisancié, P., Thim, L., Giraud, A.S., and Cuber, J.C. (2001). Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul. Pept.* *101*, 35–41.
- Morris, A.M., and Finke, R.G. (2009). Alpha-synuclein aggregation variable temperature and variable pH kinetic data: a re-analysis using the Finke-Watzky 2-step model of nucleation and autocatalytic growth. *Biophys. Chem.* *140*, 9–15.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron* *70*, 410–426.
- Munishkina, L.A., Henriques, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2004). Role of Protein–Water Interactions and Electrostatics in α -Synuclein Fibril Formation [†]. *Biochemistry* *43*, 3289–3300.

Murakami, M., Ohta, T., and Ito, S. (2009). Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* *87*, 2095–2104.

Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). <i>L-Arginine Immunoreactive Enteric Glial Cells in the Enteric Nervous System of Rat Ileum. Neurosignals 10, 336–340.

Nakai, M., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Wei, J., Akatsu, H., Ohtaka-Maruyama, C., Okado, H., and Hashimoto, M. (2007). Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *358*, 104–110.

Nakamura, T., Yamashita, H., Takahashi, T., and Nakamura, S. (2001). Activated Fyn phosphorylates alpha-synuclein at tyrosine residue 125. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *280*, 1085–1092.

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.

Naudet, N., Antier, E., Gaillard, D., Morignat, E., Lakhdar, L., Baron, T., and Bencsik, A. (2017). Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α -Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α -Synuclein Transgenic Mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *76*, 1046–1057.

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

Neunlist, M., Frieling, T., Rupprecht, C., and Schemann, M. (1998). Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon. *J. Physiol.* *506 (Pt 2)*, 539–550.

Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Labois, C.L., Galliche, J.-P., and Jarry, A. (2003). 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.* *285*, G1028-36.

Neunlist, M., Coquenlorge, S., Aubert, P., Duchalais-Dassonneville, E., des Varannes, S.B., Meurette, G., and 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.

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 90–100.

Neurath, M.F. (2012). Animal Models of Inflammatory Bowel Diseases: Illuminating the Pathogenesis of Colitis, Ileitis and Cancer. *Dig. Dis.* *30*, 91–94.

Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2 (Elsevier).

Nicoletti, A., Fagone, P., Donzuso, G., Mangano, K., Dibilio, V., Caponnetto, S., Bendtzen, K., Zappia, M., and Nicoletti, F. (2011). Parkinson's disease is associated with increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor. *Cytokine* *55*, 165–167.

Nilson, A.N., English, K.C., Gerson, J.E., Barton Whittle, T., Nicolas Crain, C., Xue, J., Sengupta, U., Castillo-Carranza, D.L., Zhang, W., Gupta, P., et al. (2016). Tau Oligomers Associate with Inflammation in the Brain and Retina of Tauopathy Mice and in Neurodegenerative Diseases. *J. Alzheimer's Dis.* *55*, 1083–1099.

- Nishimura, M., Namba, Y., Ikeda, K., and Oda, M. (1992). Glial fibrillary tangles with straight tubules in the brains of patients with progressive supranuclear palsy. *Neurosci. Lett.* *143*, 35–38.
- Noble, W., Garwood, C., Stephenson, J., Kinsey, A.M., Hanger, D.P., and Anderton, B.H. (2009). Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. *FASEB J.* *23*, 739–750.
- Noble, W., Hanger, D.P., Miller, C.C.J., and Lovestone, S. (2013). The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurol.* *4*, 83.
- Nóbrega, A.C., Rodrigues, B., Torres, A.C., Scarpel, R.D., Neves, C.A., and Melo, A. (2008). Is drooling secondary to a swallowing disorder in patients with Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat. Disord.* *14*, 243–245.
- Norris, E.H., Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., and Lee, V.M.-Y. (2003). Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J. Biol. Chem.* *278*, 27230–27240.
- Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1356–1364.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603–606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *276*, 4812–4818.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Núñez, G. (2001c). Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF-κB. *J. Biol. Chem.* *276*, 4812–4818.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* *98*, 694–702.
- Opara, J., Małeck, A., Małeczka, E., and Socha, T. (2017). Motor assessment in Parkinson's disease. *Ann. Agric. Environ. Med.* *24*, 411–415.
- Osterberg, V.R., Spinelli, K.J., Weston, L.J., Luk, K.C., Woltjer, R.L., and Unni, V.K. (2015). Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell Rep.* *10*, 1252–1260.
- Outeiro, T.F., Koss, D.J., Erskine, D., Walker, L., Kurzawa-Akanbi, M., Burn, D., Donaghy, P., Morris, C., Taylor, J.-P., Thomas, A., et al. (2019). Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol. Neurodegener.* *14*, 5.
- Ozelius, L.J., Senthil, G., Saunders-Pullman, R., Ohmann, E., Deligtisch, A., Tagliati, M., Hunt, A.L., Klein, C., Henick, B., Hailpern, S.M., et al. (2006). *LRRK2* G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* *354*, 424–425.
- Paillusson, S., Tasselli, M., Lebouvier, T., Mahé, M.M., Chevalier, J., Biraud, M., Cario-Toumaniantz, C., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2010). α -Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J. Neurochem.* *115*, 694–706.
- Paillusson, S., Clairembault, T., Biraud, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2013). Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J. Neurochem.* *125*, 512–517.
- Pal, G.D., Shaikh, M., Forsyth, C.B., Ouyang, B., Keshavarzian, A., and Shannon, K.M. (2015). Abnormal lipopolysaccharide binding protein as marker of gastrointestinal inflammation in Parkinson disease. *Front. Neurosci.* *9*, 306.

- Palacios, N., Hughes, K.C., Cereda, E., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2018). Appendectomy and risk of Parkinson's disease in two large prospective cohorts of men and women. *Mov. Disord.* *33*, 1492–1496.
- Paleologou, K.E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fernandez, C.O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W.P., et al. (2010). Phosphorylation at S87 Is Enhanced in Synucleinopathies, Inhibits α -Synuclein Oligomerization, and Influences Synuclein-Membrane Interactions. *J. Neurosci.* *30*, 3184–3198.
- Papp, M.I., Kahn, J.E., and Lantos, P.L. (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J. Neurol. Sci.* *94*, 79–100.
- Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B.I., Norris, E.H., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Ischiropoulos, H. (2001). Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *J. Neurosci.* *21*, 8053–8061.
- 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.
- Pellegrini, C., Fornai, M., Colucci, R., Tirota, E., Blandini, F., Levandis, G., Cerri, S., Segnani, C., Ippolito, C., Bernardini, N., et al. (2016). Alteration of colonic excitatory tachykinergic motility and enteric inflammation following dopaminergic nigrostriatal neurodegeneration. *J. Neuroinflammation* *13*, 146.
- Pérez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., and Avila, J. (2002). Polymerization of τ into Filaments in the Presence of Heparin: The Minimal Sequence Required for τ - τ Interaction. *J. Neurochem.* *67*, 1183–1190.
- Perry, V.H. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* *90*, 113–121.
- Perry, V.H., Nicoll, J.A.R., and Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* *6*, 193–201.
- Peter, I., Dubinsky, M., Bressman, S., Park, A., Lu, C., Chen, N., and Wang, A. (2018). Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. *JAMA Neurol.* *75*, 939.
- Pfeiffer, R.F. (2003). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* *2*, 107–116.
- Pfeiffer, R.F. (2018). Gastrointestinal Dysfunction in Parkinson's Disease. *Curr. Treat. Options Neurol.* *20*, 54.
- 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.
- Phillips, R.J., Martin, F.N., Billingsley, C.N., and Powley, T.L. (2013). Alpha-synuclein expression patterns in the colonic submucosal plexus of the aging Fischer 344 rat: implications for biopsies in aging and neurodegenerative disorders? *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e621-33.
- Pochard, C., Leclair-Visonneau, L., Coron, E., Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., and Derkinderen, P. (2018). Cyclooxygenase 2 is upregulated in the gastrointestinal tract in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *33*, 493–494.
- Poirier, A.-A., Aubé, B., Côté, M., Morin, N., Di Paolo, T., and Soulet, D. (2016). Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Parkinsons. Dis.* *2016*, 1–23.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein,

- J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.
- Poritz, L.S., Garver, K.I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., and Koltun, W.A. (2007). Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *J. Surg. Res.* 140, 12–19.
- Porter, A.J., Wattchow, D.A., Brookes, S.J., and Costa, M. (1997). The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology* 113, 1916–1923.
- Potulska, A., Friedman, A., Królicki, L., and Sychala, A. (2003). Swallowing disorders in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 9, 349–353.
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Bruley des Varannes, S., Rouaud, T., Roy, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2012). A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 45, 305–309.
- Proulx, M., De Courval, F.P., Wiseman, M.A., and Panisset, M. (2005). Salivary production in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 20, 204–207.
- Qi, H., Cantrelle, F.-X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buée, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.-C., and Landrieu, I. (2015). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation. *Biochemistry* 54, 1525–1533.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.-S., Knapp, D.J., and Crews, F.T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453–462.
- Qualman, S.J., Haupt, H.M., Yang, P., and Hamilton, S.R. (1984). Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 87, 848–856.
- Quintanilla, R.A., Orellana, D.I., González-Billault, C., and Maccioni, R.B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* 295, 245–257.
- Rabey, J.M. (2009). Hallucinations and psychosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, S105–S110.
- Ramesh, G., Bengel, S., Pahar, B., and Philipp, M.T. (2012). A possible role for inflammation in mediating apoptosis of oligodendrocytes as induced by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J. Neuroinflammation* 9, 616.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10, 514–523.
- Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 32, 256–264.
- Reynolds, C.H., Utton, M.A., Gibb, G.M., Yates, A., and Anderton, B.H. (2002). Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylates τ Protein. *J. Neurochem.* 68, 1736–1744.
- Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., et al. (2008). Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase Cy1, Grb2, and Src Family Kinases. *J. Biol. Chem.* 283, 18177–18186.
- Rideout, H.J., Larsen, K.E., Sulzer, D., and Stefanis, L. (2001). Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J. Neurochem.* 78, 899–908.
- Rideout, H.J., Dietrich, P., Savalle, M., Dauer, W.T., and Stefanis, L. (2003). Regulation of alpha-synuclein by bFGF in cultured ventral midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 84, 803–813.

- de Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., et al. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* *54*, S21-3.
- Rinne, J.O., Rummukainen, J., Paljärvi, L., Säkö, E., Mölsä, P., and Rinne, U.K. (1989). Neuronal loss in the substantia nigra in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease in relation to extrapyramidal symptoms and dementia. *Prog. Clin. Biol. Res.* *317*, 325–332.
- Rodrigues, R.W.P., Gomide, V.C., and Chadi, G. (2001). Astroglial and Microglial Reaction After A Partial Nigrostriatal Degeneration Induced by The Striatal Injection of Different Doses of 6-Hydroxydopamine. *Int. J. Neurosci.* *109*, 91–126.
- Rolli-Derkinderen, M., Leclair-Visonneau, L., Bourreille, A., Coron, E., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2019). Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J. Neurol.*
- Rosenkranz, D., Weyer, S., Tolosa, E., Gaenslen, A., Berg, D., Leyhe, T., Gasser, T., and Stoltze, L. (2007). Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* *188*, 117–127.
- Rousseaux, M.W., de Haro, M., Lasagna-Reeves, C.A., De Maio, A., Park, J., Jafar-Nejad, P., Al-Ramahi, I., Sharma, A., See, L., Lu, N., et al. (2016). TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both alpha-synuclein and tau. *Elife* *5*.
- Rousseaux, M.W., Revelli, J.-P., Vázquez-Vélez, G.E., Kim, J.-Y., Craigen, E., Gonzales, K., Beckinghausen, J., and Zoghbi, H.Y. (2018). Depleting Trim28 in adult mice is well tolerated and reduces levels of α -synuclein and tau. *Elife* *7*.
- ruhl, a. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 777–790.
- Rühl, A., Trotter, J., and Stremmel, W. (2001a). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol. Motil.* *13*, 95–106.
- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., and Stremmel, W. (2001b). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *280*, G1163–G1171.
- Russel, M.G., Dorant, E., Brummer, R.J., van de Krujjs, M.A., Muris, J.W., Bergers, J.M., Goedhard, J., and Stockbrügger, R.W. (1997). Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. *South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. Gastroenterology* *113*, 377–382.
- Saez, T.E., Pehar, M., Vargas, M., Barbeito, L., and Maccioni, R.B. Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons. *In Vivo* *18*, 275–280.
- Saikali, P., Antel, J.P., Newcombe, J., Chen, Z., Freedman, M., Blain, M., Cayrol, R., Prat, A., Hall, J.A., and Arbour, N. (2007). NKG2D-Mediated Cytotoxicity toward Oligodendrocytes Suggests a Mechanism for Tissue Injury in Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* *27*, 1220–1228.
- 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.
- Sakakibara, R., Kishi, M., Ogawa, E., Tateno, F., Uchiyama, T., Yamamoto, T., and Yamanishi, T. (2011). Bladder, Bowel, and Sexual Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinsons. Dis.* *2011*, 1–21.
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 763–770.
- Sanna, G., Del Giudice, M.G., Crosio, C., and Iaccarino, C. (2012). LRRK2 and vesicle trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1117–1122.

- Santa-María, I., Hernández, F., Smith, M.A., Perry, G., Avila, J., and Moreno, F.J. (2005). Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers. *Mol. Cell. Biochem.* *278*, 203–212.
- Sastre, M., Klockgether, T., and Heneka, M.T. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* *24*, 167–176.
- Saunders, J.A.H., Estes, K.A., Kosloski, L.M., Allen, H.E., Dempsey, K.M., Torres-Russotto, D.R., Meza, J.L., Santamaria, P.M., Bertoni, J.M., Murman, D.L., et al. (2012). CD4+ Regulatory and Effector/Memory T Cell Subsets Profile Motor Dysfunction in Parkinson's Disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *7*, 927–938.
- Sawada, H., Kohno, R., Kihara, T., Izumi, Y., Sakka, N., Ibi, M., Nakanishi, M., Nakamizo, T., Yamakawa, K., Shibasaki, H., et al. (2004). Proteasome mediates dopaminergic neuronal degeneration, and its inhibition causes alpha-synuclein inclusions. *J. Biol. Chem.* *279*, 10710–10719.
- Schapansky, J., Nardozzi, J.D., Felizia, F., and LaVoie, M.J. (2014). Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 4201–4214.
- Schell, H., Hasegawa, T., Neumann, M., and Kahle, P.J. (2009). Nuclear and neuritic distribution of serine-129 phosphorylated alpha-synuclein in transgenic mice. *Neuroscience* *160*, 796–804.
- 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 behavior disorder. *Neurology* *46*, 388–393.
- Schenck, C.H., Boeve, B.F., and Mahowald, M.W. (2013). Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a 16-year update on a previously reported series. *Sleep Med.* *14*, 744–748.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P.A.B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., et al. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.* *30*, 350–358.
- Schmidt, M.L., Murray, J., Lee, V.M., Hill, W.D., Wertkin, A., and Trojanowski, J.Q. (1991). Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* *139*, 53–65.
- Schofield, E., Kersaitis, C., Shepherd, C.E., Kril, J.J., and Halliday, G.M. (2003). Severity of gliosis in Pick's disease and frontotemporal lobar degeneration: tau-positive glia differentiate these disorders. *Brain* *126*, 827–840.
- Schulzke, J.D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., Richter, J., Bojarski, C., Schumann, M., and Fromm, M. (2009). Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1165*, 294–300.
- Schwartz, A., Spiegel, J., Dillmann, U., Grundmann, D., Bürmann, J., Faßbender, K., Schäfer, K.-H., and Unger, M.M. (2018). Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *50*, 104–107.
- See, N.A., Epstein, M.L., Dahl, J.L., and Bass, P. (1990). The myenteric plexus regulates cell growth in rat jejunum. *J. Auton. Nerv. Syst.* *31*, 219–229.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1998). Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules. *Arch. Biochem. Biophys.* *357*, 299–309.
- Sergeant, N., Wattez, A., and Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary Degeneration in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. Tau Pathologies with Exclusively "Exon10" Isoforms. *J. Neurochem.* *72*, 1243–1249.

- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G.V.W., Litersky, J.M., Schenk, D., Lieberburg, I., Trojanowski, J.Q., et al. (1995). Detection of Phosphorylated Ser²⁶² in Fetal Tau, Adult Tau, and Paired Helical Filament Tau. *J. Biol. Chem.* *270*, 18917–18922.
- Sevlever, D., Jiang, P., and Yen, S.-H.C. (2008). Cathepsin D Is the Main Lysosomal Enzyme Involved in the Degradation of α -Synuclein and Generation of Its Carboxy-Terminally Truncated Species[†]. *Biochemistry* *47*, 9678–9687.
- Sharma, N., and Nehru, B. (2015). Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochem. Int.* *87*, 92–105.
- Sharon, R., Goldberg, M.S., Bar-Josef, I., Betensky, R.A., Shen, J., and Selkoe, D.J. (2001). α -Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 9110–9115.
- Sharrad, D.F., Gai, W.-P., and Brookes, S.J.H. (2013). Selective coexpression of synaptic proteins, α -synuclein, cysteine string protein- α , synaptophysin, synaptotagmin-1, and synaptobrevin-2 in vesicular acetylcholine transporter-immunoreactive axons in the guinea pig ileum. *J. Comp. Neurol.* *521*, 2523–2537.
- Shibasaki, Y., Baillie, D.A.M., St. Clair, D., and Brookes, A.J. (1995). High-resolution mapping of SNCA encoding α -synuclein, the non-A β component of Alzheimer's disease amyloid precursor, to human chromosome 4q21.3–q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Genome Res.* *71*, 54–55.
- Shimoji, M., Pagan, F., Heaton, E.B., and Mocchetti, I. (2009). CXCR4 and CXCL12 Expression is Increased in the Nigro-Striatal System of Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* *16*, 318–328.
- Singaram, C., Ashraf, W., Gaumnitz, E.A., Torbey, C., Sengupta, A., Pfeiffer, R., and Quigley, E.M. (1995). Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet (London, England)* *346*, 861–864.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science (80-.)*. *302*, 841–841.
- Sloane, J.A., Batt, C., Ma, Y., Harris, Z.M., Trapp, B., and Vartanian, T. (2010). Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11555–11560.
- Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A., and Wolozin, B. (2003). Aggregated and monomeric α -synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J. Biol. Chem.* *278*, 11753–11759.
- Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* *119*, 7–35.
- Soto, C., and Estrada, L.D. (2008). Protein Misfolding and Neurodegeneration. *Arch. Neurol.* *65*, 184–189.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* *388*, 839–840.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L. V., and Gordon, J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15451–15455.
- Starkstein, S.E., Mayberg, H.S., Preziosi, T.J., Andrezejewski, P., Leiguarda, R., and Robinson, R.G. (1992). Reliability, validity, and clinical correlates of apathy in Parkinson's disease. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *4*, 134–139.
- STEELE, J.C., RICHARDSON, J.C., and OLSZEWSKI, J. (1964). PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY. A

HETEROGENEOUS DEGENERATION INVOLVING THE BRAIN STEM, BASAL GANGLIA AND CEREBELLUM WITH VERTICAL GAZE AND PSEUDOBULBAR PALSY, NUCHAL DYSTONIA AND DEMENTIA. *Arch. Neurol.* *10*, 333–359.

Stefanova, N., Bücke, P., Duerr, S., and Wenning, G.K. (2009). Multiple system atrophy: an update. *Lancet Neurol.* *8*, 1172–1178.

Stolzenberg, E., Berry, D., Yang, D., Lee, E.Y., Kroemer, A., Kaufman, S., Wong, G.C.L., Oppenheim, J.J., Sen, S., Fishbein, T., et al. (2017). A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. *J. Innate Immun.* *9*, 456–463.

Strauss, S., Bauer, J., Ganter, U., Jonas, U., Berger, M., and Volk, B. (1992). Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab. Invest.* *66*, 223–230.

Su, X., Maguire-Zeiss, K.A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., and Federoff, H.J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* *29*, 1690–1701.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J. Biol. Chem.* *286*, 4566–4575.

Summerton, C.B., Longlands, M.G., Wiener, K., and Shreeve, D.R. (2002). Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 841–845.

Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 631–659.

Svensson, E., Horváth-Puhó, E., Stokholm, M.G., Sørensen, H.T., Henderson, V.W., and Borghammer, P. (2016). Appendectomy and risk of Parkinson's disease: A nationwide cohort study with more than 10 years of follow-up. *Mov. Disord.* *31*, 1918–1922.

Swanson, R.A., Ying, W., and Kauppinen, T.M. (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr. Mol. Med.* *4*, 193–205.

Sznejder-Pacholek, A., Joniec-Maciejak, I., Wawer, A., Ciesielska, A., and Mirowska-Guzel, D. (2017). The effect of α -synuclein on gliosis and IL-1 α , TNF α , IFN γ , TGF β expression in murine brain. *Pharmacol. Reports* *69*, 242–251.

Takahashi, M., Tomizawa, K., Ishiguro, K., Takamatsu, M., Fujita, S.C., and Imahori, K. (1995). Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. *J. Neurochem.* *64*, 1759–1768.

Takano, T., Kang, J., Jaiswal, J.K., Simon, S.M., Lin, J.H.-C., Yu, Y., Li, Y., Yang, J., Diemel, G., Zielke, H.R., et al. (2005). Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 16466–16471.

Takuma, H., Arawaka, S., and Mori, H. (2003). Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *142*, 121–127.

Tam, P.K. (1990). An immunohistological study of the human enteric nervous system with microtubule-associated proteins. *Gastroenterology* *99*, 1841–1844.

Tamo, W., Imaizumi, T., Tanji, K., Yoshida, H., Mori, F., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Fukuda, I., Wakabayashi, K., and Satoh, K. (2002). Expression of alpha-synuclein, the precursor of non-amyloid beta 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.

Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S.,

- Kasten, M., Chade, A.R., et al. (2011). Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ. Health Perspect.* *119*, 866–872.
- Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., and Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* *8*, 2797–2801.
- Tatebayashi, Y., Haque, N., Tung, Y.-C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2004). Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of organelle transport. *J. Cell Sci.* *117*, 1653–1663.
- Taylor, K.S.M., Cook, J.A., and Counsell, C.E. (2007). Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *78*, 905–906.
- Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.-K., Wu, D.-C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2003). Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5473–5478.
- Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* *118*, 331–340.
- Toebosch, S., Tudyka, V., Masclee, A., and Koek, G. (2012). Treatment of recurrent sigmoid volvulus in Parkinson's disease by percutaneous endoscopic colostomy. *World J. Gastroenterol.* *18*, 5812.
- Tofaris, G.K., Layfield, R., and Spillantini, M.G. (2001). alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* *509*, 22–26.
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil.* *15*, 239–242.
- Del Tredici, K., Hawkes, C.H., Ghebremedhin, E., and Braak, H. (2010). Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* *119*, 703–713.
- Tropini, C., Earle, K.A., Huang, K.C., and Sonnenburg, J.L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host Microbe* *21*, 433–442.
- Tumilasci, O.R., Cersósimo, M.G., Belforte, J.E., Micheli, F.E., Benarroch, E.E., and Pazo, J.H. (2006). Quantitative study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *21*, 660–667.
- Ubogu, E.E., Cossoy, M.B., and Ransohoff, R.M. (2006). The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 48–55.
- Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11282–11286.
- Umeno, J., Asano, K., Matsushita, T., Matsumoto, T., Kiyohara, Y., Iida, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., and Kubo, M. (2011). Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 2407–2415.
- Unger, M.M., Spiegel, J., Dillmann, K.-U., Grundmann, D., Philippeit, H., Bürmann, J., Faßbender, K., Schwartz, A., and Schäfer, K.-H. (2016). Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat. Disord.* *32*, 66–72.
- Uversky, V.N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *J. Neurochem.* *0*, 070710052154012-???
- Uversky, V.N., Li, J., and Fink, A.L. (2001). Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation. *J. Biol. Chem.* *276*, 10737–10744.

- Verstraeten, A., Theuns, J., and Van Broeckhoven, C. (2015). Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet.* *31*, 140–149.
- Villarán, R.F., Espinosa-Oliva, A.M., Sarmiento, M., De Pablos, R.M., Argüelles, S., Delgado-Cortés, M.J., Sobrino, V., Van Rooijen, N., Venero, J.L., Herrera, A.J., et al. (2010). Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: potential risk factor in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *114*, 1687–1700.
- Villumsen, M., Aznar, S., Pakkenberg, B., Jess, T., and Brudek, T. (2019). Inflammatory bowel disease increases the risk of Parkinson's disease: a Danish nationwide cohort study 1977–2014. *Gut* *68*, 18–24.
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). Wild Type α -Synuclein Is Degraded by Chaperone-mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 23542–23556.
- Vulliet, R., Halloran, S.M., Braun, R.K., Smith, A.J., and Lee, G. (1992). Proline-directed phosphorylation of human Tau protein. *J. Biol. Chem.* *267*, 22570–22574.
- 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.* *76*, 217–221.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., and Ikuta, F. (1990). Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* *79*, 581–583.
- Wake, H., Lee, P.R., and Fields, R.D. (2011). Control of Local Protein Synthesis and Initial Events in Myelination by Action Potentials. *Science (80-.)*. *333*, 1647–1651.
- Wang, J.-Z., Gong, C.-X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Dephosphorylation of Alzheimer Paired Helical Filaments by Protein Phosphatase-2A and -2B. *J. Biol. Chem.* *270*, 4854–4860.
- Wang, Q., Liu, Y., and Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl. Neurodegener.* *4*, 19.
- Ward, S.M., McLaren, G.J., and Sanders, K.M. (2006). Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J. Physiol.* *573*, 147–159.
- Watson, M.B., Richter, F., Lee, S.K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R.B., and Chesselet, M.-F. (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp. Neurol.* *237*, 318–334.
- Waxman, E.A., and Giasson, B.I. (2008). Specificity and regulation of casein kinase-mediated phosphorylation of alpha-synuclein. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *67*, 402–416.
- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C. (2003). α -Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 25009–25013.
- Weimers, P., Halfvarson, J., Sachs, M.C., Saunders-Pullman, R., Ludvigsson, J.F., Peter, I., Burisch, J., and Olén, O. (2019). Inflammatory Bowel Disease and Parkinson's Disease: A Nationwide Swedish Cohort Study. *Inflamm. Bowel Dis.* *25*, 111–123.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *72*.
- 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* *35*, 13709–13715.
- Welcker, K., Martin, A., Kölle, P., Siebeck, M., and Gross, M. (2004). Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Med. Res.* *9*, 456–460.
- Wenning, G.K., Stefanova, N., Jellinger, K.A., Poewe, W., and Schlossmacher, M.G. (2008). Multiple system

atrophy: A primary oligodendroglialopathy. *Ann. Neurol.* *64*, 239–246.

Whitehouse, P.J. (1987). Clinical and neurochemical consequences of neuronal loss in the nucleus basalis of Meynert in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Adv. Neurol.* *45*, 393–397.

Whittle, B.J., Higgs, G.A., Eakins, K.E., Moncada, S., and Vane, J.R. (1980). Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* *284*, 271–273.

Wilms, H., Rosenstiel, P., Romero-Ramos, M., Arlt, A., Schäfer, H., Seegert, D., Kahle, P.J., Odoj, S., Claasen, J.H., Holzknecht, C., et al. (2009). Suppression of Map Kinases Inhibits Microglial Activation and Attenuates Neuronal Cell Death Induced by α -Synuclein Protofibrils. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *22*, 897–909.

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.

Withers, G.S., George, J.M., Banker, G.A., and Clayton, D.F. (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *99*, 87–94.

Wooten, G.F., Currie, L.J., Bovbjerg, V.E., Lee, J.K., and Patrie, J. (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *75*, 637–639.

Wray, S., Saxton, M., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2008). Direct analysis of tau from PSP brain identifies new phosphorylation sites and a major fragment of N-terminally cleaved tau containing four microtubule-binding repeats. *J. Neurochem.* *105*, 2343–2352.

Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* *448*, 427–434.

Yamamoto, H., Saitoh, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H., and Miyamoto, E. (1988). Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J. Neurochem.* *50*, 1614–1623.

Yamin, G., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2003). Nitration inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro by formation of soluble oligomers. *FEBS Lett.* *542*, 147–152.

Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* *4*, e6073.

Yang, Z., and Wang, K.K.W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* *38*, 364–374.

Yenari, M.A., Kunis, D., Sun, G.H., Onley, D., Watson, L., Turner, S., Whitaker, S., and Steinberg, G.K. (1998). Hu23F2G, an Antibody Recognizing the Leukocyte CD11/CD18 Integrin, Reduces Injury in a Rabbit Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. *Exp. Neurol.* *153*, 223–233.

Yilmaz, R., Bayram, E., Ulukan, Ç., Altinok, M.K., and Akbostancı, M.C. (2017). Appendectomy History is not Related to Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* *7*, 347–352.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* *53*, 337–351.

Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Xu, S., Liu, C., Gao, Y., Yang, H., et al. (2007). Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* *145*, 539–555.

Zaguia, F., Saikali, P., Ludwin, S., Newcombe, J., Beauseigle, D., McCrea, E., Duquette, P., Prat, A., Antel, J.P., and Arbour, N. (2013). Cytotoxic NKG2C⁺ CD4 T Cells Target Oligodendrocytes in Multiple Sclerosis.

J. Immunol. *190*, 2510–2518.

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* *56*, 61–72.

Zhu, F., Li, C., Gong, J., Zhu, W., Gu, L., and Li, N. (2019). The risk of Parkinson's disease in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis.* *51*, 38–42.

Titre : Expression et agrégation des protéines α -synucléine et Tau dans le système nerveux entérique en conditions inflammatoires

Mots clés : α -synucléine, Tau, inflammation, système nerveux entérique, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Résumé : Les synucléinopathies et les tauopathies sont des maladies neurodégénératives caractérisées par une accumulation anormale et une agrégation des protéines α -synucléine et Tau, respectivement. L'neuroinflammation joue un rôle central sur les fonctions physiologiques et l'agrégation de ces deux protéines. Parallèlement, au cours de la maladie de Parkinson, on retrouve les inclusions d' α -synucléine tout au long du tractus digestif et de nombreuses études ont mis en évidence la présence d'une inflammation intestinale chez les patients parkinsoniens. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'inflammation intestinale pourrait altérer la régulation de ces deux protéines, mener à leur agrégation et possiblement leur propagation vers le SNC, et que le concept de synucléinopathie entérique pourrait s'étendre aux tauopathies. Ainsi,

les objectifs de notre projet visaient à étudier le rôle de l'inflammation intestinale aiguë et chronique sur la régulation et l'agrégation de l' α -synucléine et Tau. Nous avons montré, *in vitro* et *in vivo*, qu'une inflammation intestinale aiguë régulait à la baisse l' α -synucléine via une voie p38 dépendante. Inversement, dans des biopsies de patients Crohn, nous avons observé une régulation à la hausse de l' α -synucléine et de Tau, en l'absence de formes pathologiques. Cette régulation n'était pas liée à un mécanisme transcriptionnel mais serait due à une diminution de la dégradation de ces deux protéines via une voie NRF2/NDP52 dépendante. Ainsi, nos travaux suggèrent que l'inflammation intestinale altère l'expression de ces deux protéines clés et pourrait, sur le long terme, participer à leur pathogénicité.

Title: Expression and aggregation of α -synuclein and Tau in the enteric nervous system under inflammatory conditions

Keys words: α -synuclein, Tau, inflammation, enteric nervous system, chronic inflammatory bowel disease

Abstract: Synucleinopathies and tauopathies are neurodegenerative diseases characterized by abnormal accumulation and aggregation of the proteins α -synuclein and Tau, respectively. Neuroinflammation plays a central role in the physiological functions and aggregation of these two proteins. During Parkinson's disease, α -synuclein inclusions are found throughout the digestive tract and many studies have shown the presence of intestinal inflammation in Parkinson's patients. In this context, we hypothesized that intestinal inflammation could alter the regulation of these two proteins and that the concept of enteric synucleinopathy could extend to tauopathies. Thus, the objectives of our project aimed to study the role of acute and chronic

intestinal inflammation on the regulation and aggregation of α -synuclein and Tau. We have shown, *in vitro* and *in vivo*, that acute intestinal inflammation downregulates α -synuclein via a p38 pathway, and that this regulation is specific to enteric neurons. On the other hand, in biopsies of Crohn's disease patients, we have observed an upregulation of α -synuclein and Tau, in the absence of pathological forms. This regulation was not linked to a transcriptional mechanism but to a decrease in the degradation of these two proteins throughout a NRF2/NDP52 pathway. Therefore, our work suggests that intestinal inflammation dysregulates the expression of these two key proteins and could, in the long term, contribute to their pathogenicity.