

Thèse de Doctorat

Thomas CLAIREMBAULT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie
Spécialité : Neurosciences
Unité de recherche : INSERM U913

Soutenue le 16 Octobre 2015

Thèse N° : 23

Caractérisation de l'atteinte de l'unité neuro-glio- épithéliale entérique dans la maladie de Parkinson à travers l'utilisation de biopsies épithéliales coliques humaines.

JURY

Rapporteurs : **Jean-Pierre MOTHET**, PhD, DR, CNRS UMR7286, Marseille
Fabian DOCAGNE, PhD, CR, INSERM U919, Caen

Directeur de Thèse : **Pascal DERKINDEREN**, MD, PhD, PU-PH, INSERM U913, Nantes

Co-directeur de Thèse : **Michel NEUNLIST**, PhD, DR, INSERM U913, Nantes

Caractérisation de l'atteinte de l'unité neuro-glio-épithéliale entérique dans la maladie de Parkinson à travers l'utilisation de biopsies épithéliales coliques humaines.

Remerciements

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Pascal Derkinderen dont la puissance intellectuelle a été le principal moteur de ce travail et sans qui je ne serai sans doute pas allé bien loin dans le sulfureux domaine du côlon distal des parkinsoniens. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir apporté un soutien 24h/24 pendant ces 3 années.

Merci également à Malvyne Derkinderen qui m'a accueilli à l'U913 au tout début et qui a su cultiver et faire fructifier mon intérêt pour la recherche scientifique.

Je remercie Michel Neunlist pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire mais également pour son aide et ses grandes capacités de prise de recul qui ont été précieuses sur de nombreux aspects de ce travail.

Merci à Laurène Leclair-Visonneau, Tiphaine Rouaud, Emmanuel Coron, Arnaud Boureille et Fabienne Vavasseur ainsi qu'aux personnes de leurs services respectifs, impliquées de près ou de loin, pour le travail considérable mené autour des études cliniques sur lesquelles ce travail est basé.

Merci au Centre d'Entraide et de Coordination des Associations de Parkinsoniens qui a fourni un appui important pour la réalisation de ce travail.

Merci à Bernard Lardeux pour ses conseils avisés et les nombreuses régates que nous avons disputées ensemble.

Merci à Julien Chevalier pour les soirées cinéma qui permettaient de se changer les idées après les longues journées de laboratoire.

Merci à Philippe Aubert et Tony Durand pour les sorties pistoche qui faisaient un bien fou et les nombreuses blagues plus ou moins élégantes mais toujours drôles et permettant de décompresser.

Merci à Arnaud Peyre et Laura Masson, mes deux stagiaires, qui ont abattu une quantité phénoménale de travail.

Merci à tous les chercheurs, post-docs, thésards, M2, M1, L3, L2, avec qui j'ai partagé de bons moments aussi bien à la paillasse qu'en dehors et dont la liste est bien trop longue pour être développée ici.

D'une manière plus générale merci à mon entourage, la famille et les copains, pour avoir été là et pour leur soutien durant toutes ces années.

Merci à mes parents qui m'ont toujours encouragé dans les études et m'ont donné les moyens d'accomplir mes choix d'orientation.

Un immense merci à Manue, ma chère et tendre, qui a pu supporter 3 ans de thèse sans me flanquer à la porte et avec qui je partage des moments incroyables depuis le 1^{er} jour.

Sommaire

Remerciements	4
Liste des abréviations	9
Introduction.....	10
1. Notion d'UNGE	11
1.1. Généralités sur le SNE et l'UNGE.....	11
2. La barrière épithéliale intestinale.....	13
2.1. Généralités	13
2.2. Organisation de la BEI	13
2.3. Composants extracellulaires de la BEI.....	14
2.4. Composants cellulaires de la BEI	15
2.4.1. Les cellules souches épithéliales intestinales.....	15
2.4.2. Les entérocytes.....	15
2.4.3. Les cellules caliciformes	16
2.4.4. Les cellules entéroendocrines	17
2.4.5. Les cellules de Paneth	17
2.5. Composants moléculaires de la BEI.....	18
2.5.1. Généralités	18
2.5.2. Les jonctions serrées	19
2.5.3. Les jonctions adhérentes et les desmosomes.....	20
2.6. Homéostasie de la BEI	21
2.7. La BEI dans les pathologies digestives.....	23
3. Les neurones entériques	24
3.1. Les neurones afférents primaires intrinsèques.....	27
3.2. Les interneurones.....	27
3.3. Les neurones moteurs.....	27
3.4. Les fonctions des neurones entériques.....	28
3.4.1. Contrôle nerveux de la motricité digestive	28
3.4.2. Contrôle nerveux de la sécrétion intestinale (le réflexe sécrétomoteur)	29
3.4.3. Contrôle nerveux de la BEI	31
3.5. Le SNE est connecté au SNC	32
3.5.1. Voies afférentes.....	33

3.5.2. Voies efférentes	33
4. La glie entérique.....	34
4.1. Place de la glie entérique dans le SNE.....	34
4.2. Les marqueurs des CGE	36
4.3. La GFAP en particulier	38
4.3.1. Généralités sur la GFAP	38
4.3.2. Isoformes de la GFAP.....	39
4.3.3. Structure de la GFAP.....	41
4.3.4. Modifications post-traductionnelles de la GFAP	41
4.3.5. Rôle de la GFAP	42
4.3.6. La GFAP et l'activation gliale dans les pathologies.....	46
4.4. CGE et fonctions motrices du TD.....	47
4.5. CGE et neurotransmission dans le SNE	48
4.6. CGE et Régulation de la BEI	49
4.7. La glie entérique dans les pathologies digestives	52
5. La maladie de Parkinson.....	53
5.1. Aspects cliniques et neuropathologiques classiques de la MP	53
5.2. Les pathologies de Lewy : corps et neurites de Lewy	53
5.3. La MP est aussi une maladie digestive	55
5.3.1. Troubles digestifs dans la MP	55
5.3.2. Atteinte neuropathologique dans le TD	56
5.4. L'UNGE dans la MP	58
Hypothèses et objectifs.....	59
Article 1 : Expression et phosphorylation de la GFAP entérique dans la maladie de Parkinson.	60
Article 2 : Altérations structurales de la barrière épithéliale intestinale dans la maladie de Parkinson	73
Discussion.....	86
Conclusion	92
Articles de revue.....	94
Article 3 : Le système nerveux entérique : une fenêtre sur l'atteinte du système nerveux central dans la maladie de Parkinson	94
Article 4 : Les cellules gliales entériques : nouveaux acteurs dans la maladie de Parkinson ?	100
Participation à des travaux tiers.....	107
Article 5 : Sécrétion activité-dépendante de l'alpha-synucléine par les neurones entériques.	107

Article 6 : Implication du système nerveux autonome périphérique dans un cas de parkinsonisme lié à la maladie de Gaucher.....	115
Bibliographie.....	121

Liste des abréviations

15dPGJ2	15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2	MLC	Myosin light chain
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine	MLCK	Myosin light chain kinase
ACh	Acétylcholine	MP	Maladie de Parkinson
ARNm	Acide ribonucléique messenger	MPT	Modification post-traductionnelle
BEI	Barrière épithéliale intestinale	NGF	Nerve growth factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique	NL	Neurite de Lewy
BMP	Bone morphogenetic protein	NO	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
CCK	Cholécystokinine	NOS	Oxyde nitrique synthase
CEI	Cellule épithéliale intestinale	PACAP	Adénylyl cyclase pituitaire
CGE	Cellule gliale entérique	PM	Plexus myentérique
CGRP	Calcitonin gene related peptide	ProEGF	Précurseur de l'épidermal growth factor
CL	Corps de Lewy	PSM	Plexus sous-muqueux
CSEI	Cellule souche épithéliale intestinale	RCH	Rectocolite hémorragique
Cx43	Connexine 43	Reg III	Regenerated islet-derived protein III
Da	Dalton	ROCK	Rho associated kinase
FI	Filament intermédiaire	S100 β	S100 Ca ²⁺ binding protein beta
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor	SNC	Système nerveux central
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	SNE	Système nerveux entérique
GLP	Glucagon like peptide	SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
GSNO	Glutathion-S-nitrosylé	TD	Tube digestif
IL	Interleukine	TGF β	Transforming growth factor beta
INF γ	Interféron gamma	TNF α	Tumor necrosis factor alpha
IPAN	Intrinsic primary afferent neuron	UNGE	Unité neuro-glio-épithéliale
JAM	Junction adhesion molecule	VIP	Peptide vasoactif intestinal
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	ZO	Zonula occludens

Introduction

Chez l'homme l'appareil digestif comporte deux groupes d'organes : les organes du tube digestif (TD) et les organes annexes au TD. Le TD mesure 8 mètres en moyenne. Il s'étale de la cavité orale à l'anus en passant dans l'ordre par le pharynx, l'œsophage, l'estomac et l'intestin qui aboutit au rectum lequel débouche sur l'anus. L'intestin est divisé en deux parties principales avec dans le même ordre tout d'abord le petit intestin ou intestin grêle (avec le duodénum, le jéjunum puis l'iléon) et ensuite le gros intestin ou côlon (avec le caecum, le côlon ascendant ou droit, le côlon transverse, le côlon descendant ou gauche et enfin le côlon sigmoïde). La connexion entre ces deux parties se fait via la valvule iléo-caecale de Bauhin. Parmi les organes annexes on retrouve les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire ainsi que le pancréas. Ces organes sont reliés au TD via des canaux spécifiques.

La paroi des différents organes du TD est organisée d'une façon commune en cinq couches tissulaires successives distinctes appelées « tuniques » (Figure 1). La première est la muqueuse épithéliale : c'est la tunique la plus interne, celle qui borde la lumière intestinale ou lumen. Elle se compose d'un épithélium digestif formé d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales insérées sur une lame basale. Vient ensuite la *lamina propria* ou chorion, un tissu conjonctif qui contient des follicules lymphoïdes et qui est riche en vaisseaux sanguins liés à la fonction d'absorption des nutriments. La deuxième est la musculaire muqueuse ou *muscularis mucosae* : elle est en contact avec la muqueuse épithéliale et est constituée de fibres musculaires lisses. La troisième est la sous-muqueuse : elle est constituée des tissus conjonctifs et comporte également des vaisseaux sanguins et lymphatiques et surtout le plexus nerveux de Meissner ou plexus sous-muqueux. La quatrième est la musculuse : cette tunique comporte deux couches de muscles lisses : le muscle circulaire interne et le muscle longitudinal externe. On trouve entre ces deux couches le plexus nerveux d'Auerbach également appelé plexus myentérique. La cinquième est la séreuse : c'est la tunique la plus externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif qui la rend solidaire aux organes intra péritonéaux et a un rôle protecteur.

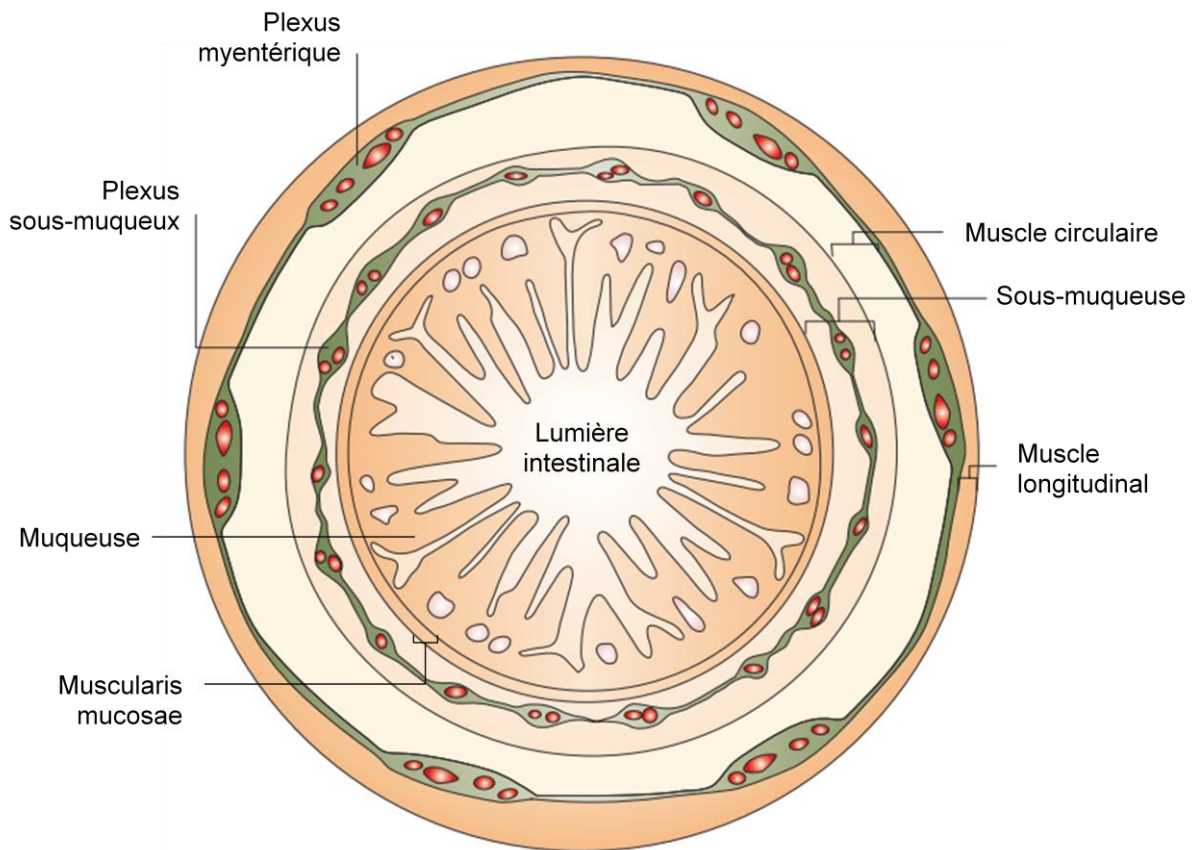


Figure 1 : Représentation schématique d'une section transversale de l'intestin grêle mettant en évidence les ganglions nerveux en vert. Adapté de (Heanue and Pachnis 2007).

1. Notion d'UNGE

1.1. Généralités sur le SNE et l'UNGE

Le TD est un organe qui de prime abord paraît simple alors qu'en réalité il est étonnamment complexe. En effet pour assurer ses fonctions d'absorption des nutriments, de motricité et de motilité pour faire avancer le bol alimentaire de la bouche à l'anus et aussi de protection de l'organisme face aux bactéries pathogènes et aux substances toxiques présentes dans sa lumière, le TD concentre en son sein une diversité cellulaire impressionnante. Cette diversité s'exprime non seulement par la présence du microbiote intestinal au niveau du lumen qui comporte 100 fois plus de bactéries que notre corps ne compte de cellules mais également au sein même des différentes tuniques de sa paroi. Afin de former une barrière protectrice entre le milieu luminal et le milieu intérieur de l'organisme, on retrouve dans l'épithélium des cellules nécessaires à l'absorption des nutriments (les entérocytes), des cellules permettant le renouvellement de l'épithélium intestinal (les cellules souches intestinales) et aussi des cellules accomplissant des tâches de protection, de régulation homéostatique et de défense de l'épithélium (respectivement les cellules

mucosécrétantes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth). De l'autre côté de cette barrière, 80% des cellules immunitaires de notre corps sont présentes afin de protéger l'organisme d'éventuels débordements infectieux dans un premier temps et aussi d'éduquer notre système immunitaire face au monde extérieur. Associées à cette diversité, il faut ajouter les cellules musculaires lisses dont l'intérêt n'est plus à démontrer puisque leur organisation en deux couches permet les contractions circulaires internes de péristaltisme (empêchant le reflux) et longitudinales externes (pour la propulsion) nécessaires au cheminement du bol alimentaire.

L'ensemble de ces fonctions et leur coordination est si complexe qu'un système nerveux entier intrinsèque au TD et autonome y est dédié : le système nerveux entérique (SNE). C'est une caractéristique que l'on ne retrouve dans aucun autre organe du corps humain et qui permet en plus aux fonctions du TD d'être contrôlées même quand celui-ci est complètement séparé du système nerveux central (SNC) (Bayliss and Starling 1899). Cependant même si ce contrôle nerveux intégré peut fonctionner de façon autonome c'est un système qui implique des interactions entre les réflexes entériques locaux, les réflexes qui passent par les ganglions sympathiques et les réflexes qui passent des intestins vers le SNC. Le SNE est organisé en réseau sur toute la longueur du TD depuis le tiers inférieur œsophagien jusqu'au rectum. Il comporte environ 200 millions de neurones (soit environ autant que dans la moelle épinière) et 5 fois plus de cellules gliales entériques (CGE). Il est organisé en deux plexus : le plexus sous muqueux (PSM) ou de Meissner et le plexus myentérique (PM) ou de Auerbach. Les plexus sont composés de ganglions nerveux composés de neurones entériques et de CGE. Les ganglions sont interconnectés entre eux par des fibres nerveuses formées des prolongements des neurones présents dans ces ganglions. Des fibres nerveuses approvisionnent également les tissus effecteurs comme l'épithélium intestinal ainsi que les muscles et les vaisseaux sanguins de la paroi intestinale. Ainsi le PSM contrôle principalement la fonction de barrière du TD tandis que le PM intervient dans le contrôle de la motricité et de la motilité digestive (Furness 2012).

La fonction sans doute la plus importante du TD est d'assurer une barrière entre le milieu luminal et le milieu intérieur de l'organisme. Cette barrière matérialisée par l'épithélium intestinal permet de protéger l'organisme des agressions extérieures (bactéries pathogènes et toxiques alimentaires) tout en permettant le passage des nutriments, de l'eau et des électrolytes. Elle est finement régulée par le SNE et en retour elle peut également moduler l'activité du SNE en fonction de son état. Ainsi pour assurer les fonctions du TD, un dialogue s'installe entre les neurones entériques, les cellules gliales entériques et les cellules épithéliales intestinales de sorte que cette triade cellulaire forme une véritable unité fonctionnelle : l'unité neuro-glio-épithéliale intestinale (Neunlist *et al.* 2013).

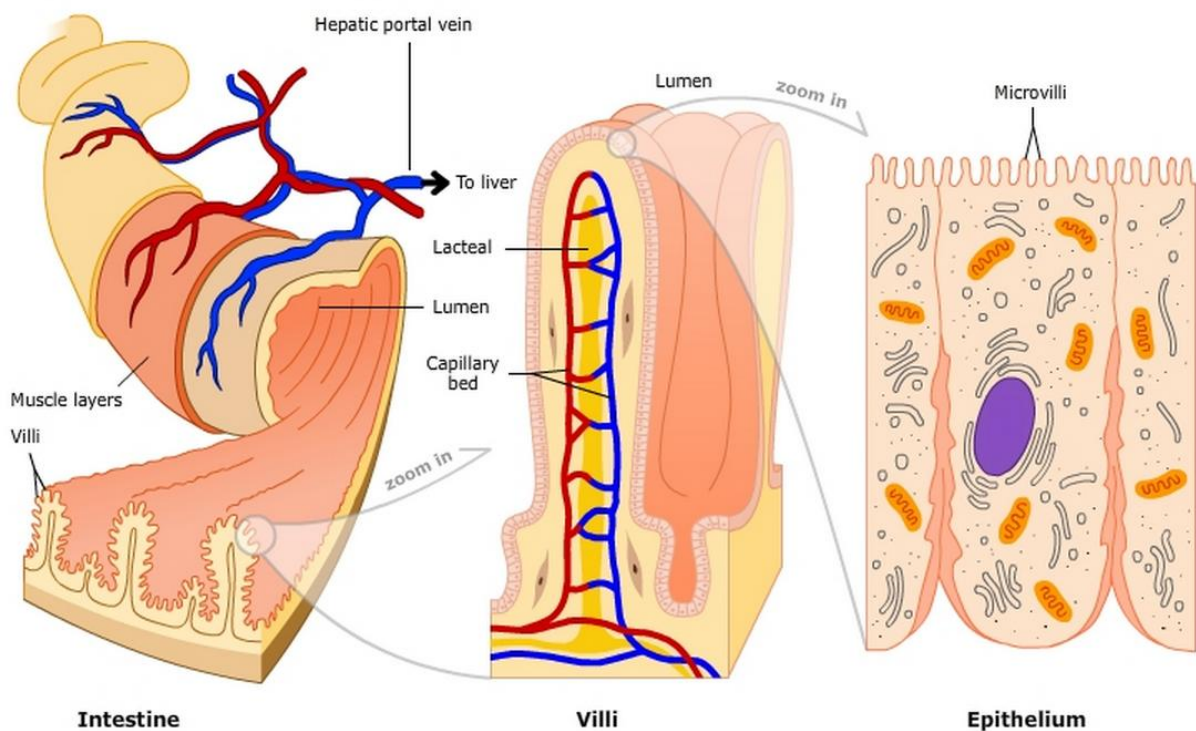
2. La barrière épithéliale intestinale

2.1. Généralités

De la même manière que pour de nombreux organismes pluricellulaires, le corps humain interagit avec le monde extérieur au niveau de zones appelées des interfaces. La muqueuse des voies digestives en est une, tout comme la peau, la muqueuse des voies respiratoires ou encore de l'appareil uro-génital. On a tendance à imaginer que la peau, peut-être du fait qu'elle soit la plus visible et accessible, serait l'interface couvrant la plus grande surface. En réalité ses 1,7m² de moyenne la classe loin derrière la muqueuse des voies respiratoires elle-même loin derrière la muqueuse intestinale. La surface d'échange de l'intestin grêle a été estimée à 120 m² (Kararli 1995) ce qui représente un peu plus de la moitié d'un terrain de tennis même si les estimations varient de façon importante selon les études (Helander and Fändriks 2014). L'épithélium intestinal représente donc une surface colossale qui est en contact avec le monde extérieur et avec une diversité de substances, toxiques ou non, et de micro-organismes, pathogènes ou non, phénoménale. Le rôle de barrière que joue l'épithélium est ainsi primordial pour la protection de l'organisme. Pour assurer sa fonction, cette barrière épithéliale intestinale (BEI) doit accomplir deux tâches paradoxales : permettre le passage des nutriments, de l'eau et des électrolytes, tout en empêchant le passage des micro-organismes pathogènes et des substances toxiques. Cette capacité est permise grâce à l'organisation structurelle et la compartimentation de l'épithélium intestinal. De plus elle est hautement modulée par la composition de son micro-environnement luminal, le microbiote intestinal, et de son micro-environnement interne, les cellules immunitaires et les cellules du SNE (Neunlist *et al.* 2013).

2.2. Organisation de la BEI

La BEI est composée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI), de la *lamina propria* et de la musculaire muqueuse. Elle est organisée en 3 niveaux qui permettent d'augmenter la surface des échanges : les plis circulaires transversaux ou valvules conniventes, les villosités et les cryptes intestinales et les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes (Figure 2). Dans le côlon l'épithélium comporte une succession de cryptes alternant avec une surface plane. Les cryptes délimitent des zones de prolifération cellulaire alors que les villosités délimitent des zones de différenciation. On peut déterminer 3 groupes principaux de composants de la BEI : les composants extracellulaires, les composants cellulaires et les composants moléculaires.



© 2007-2011 The University of Waikato

Figure 2 : Schéma de l'organisation de l'épithélium intestinal avec à gauche une coupe du TD montrant les plis circulaires composés des villosités intestinales. Au milieu se trouve la structure d'une villosité intestinale. A droite on observe les cellules épithéliales intestinales présentant des microvillosités sur leur pôle apical (©2007-2011 The University of Waikato).

2.3. Composants extracellulaires de la BEI

La surface de la muqueuse épithéliale intestinale est recouverte d'un gel hydraté que l'on appelle le mucus. Il est formé par des mucines sécrétées par les cellules muco-sécrétantes et est organisé en 2 couches. La première couche est superficielle et est colonisée par des bactéries tandis que la deuxième est plus interne, au contact des CEI. Celle-ci est plus compacte et stable car elle est protégée par la première couche de l'agitation et des forces de convections qui règnent à la surface. Contrairement à cette dernière, elle n'est pas colonisée par des bactéries. Les mucines forment des polymères de très grande taille (supérieure à $100 \cdot 10^6$ Da) ce qui permet de donner cet aspect de « gel » au mucus. La mucine MUC2 est la principale forme retrouvée dans les deux couches (Johansson *et al.* 2011). Le mucus crée une première barrière empêchant les grosses particules et la plupart des bactéries de venir au contact de l'épithélium intestinal (Johansson *et al.* 2008). Il permet également de lubrifier la paroi intestinale ce qui permet de faciliter le voyage du bol alimentaire.

L'action du mucus dans la BEI est également renforcée par la présence de peptides anti-microbiens et de protéines comme le lysozyme. Pour protéger l'épithélium des agressions par des micro-organismes ce sont les cellules de Paneth qui produisent un large choix de facteurs antimicrobiens parmi lesquels on retrouve les alpha-défensines, le lysozyme et Reg III (*Regenerated islet-derived protein III*) (Jones and Bevins 1992; Deckx *et al.* 1967; Cash *et al.* 2006). Les peptides anti-microbiens interviennent également dans le façonnage de la composition du microbiote colonisant le mucus (Salzman *et al.* 2010). Ces deux fonctions ne sont pas nécessairement incompatibles puisque un des effets positifs du microbiote intestinal est de protéger l'hôte des pathogènes à travers un mécanisme de résistance à la colonisation. Sachant que des infections par des microbes entéropathogènes peuvent modifier de façon importante la composition du microbiote, l'action des peptides anti-microbiens est la bienvenue (Clevers and Bevins 2013).

2.4. Composants cellulaires de la BEI

2.4.1. Les cellules souches épithéliales intestinales

Les CEI proviennent des cellules souches épithéliales intestinales (CSEI) situées au fond des cryptes intestinales. Les CSEI permettent le renouvellement de l'épithélium intestinal selon l'axe crypte → villosité en fournissant les 4 types de CEI qui sont les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules entéroendocrines, les cellules calciformes ou mucosécrétantes et les cellules de Paneth (Figure 3) (Sancho *et al.* 2003).

2.4.2. Les entérocytes

Le premier des 4 types cellulaires différenciés principaux que l'on retrouve dans l'épithélium intestinal est celui des entérocytes (Figure 3b). Il s'agit des cellules les plus représentées dans la BEI. Les entérocytes sont responsables de l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes. Ils sont caractérisés par la présence d'une bordure en brosse formée des microvillosités. Celles-ci ont un diamètre d'environ 100nm qui reste constant parmi les entérocytes et sont ordonnées de façon très régulière sur le côté apical des entérocytes (Crawley *et al.* 2014). Cette bordure en brosse est un niveau supplémentaire d'organisation de l'interface entre la lumière intestinale et le milieu intérieur qui permet d'augmenter de façon très importante la surface des échanges. Ainsi des estimations basées sur des données morphométriques suggèrent que les microvillosités augmentent de 9 à 16 fois la surface de l'intestin grêle (Helander and Fändriks 2014). Les microvillosités sont

également recouvertes du glycocalyx, qui est riche en glycolipide et glycoprotéines. Celui-ci joue un rôle protecteur et contient différents types de protéines comme des enzymes et des transporteurs qui interviennent dans l'absorption des nutriments (Johansson *et al.* 2011).

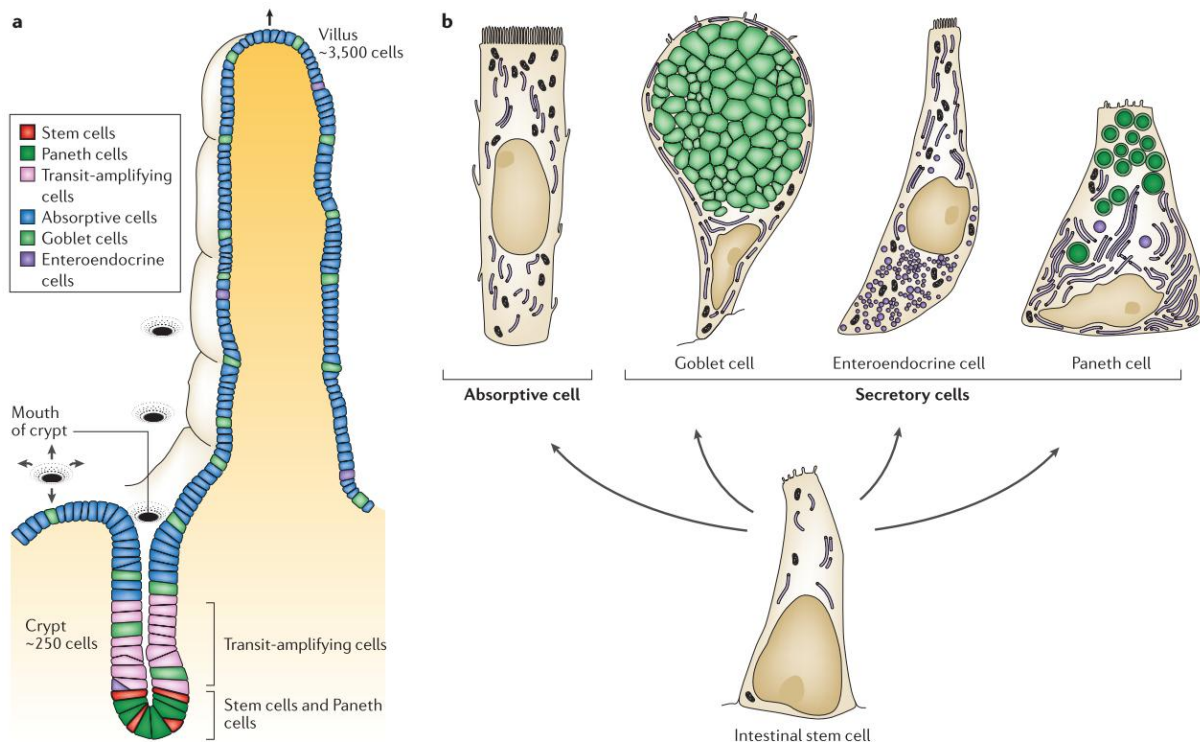


Figure 3 : a) Répartition des différents types de CEI dans l'épithélium intestinal. b) Les CEI : Les CSEI donnent naissance à 4 types cellulaires différenciés : les cellules absorbatives ou entérocytes, les cellules goblet ou mucosécrétantes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (Crosnier *et al.* 2006).

2.4.3. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes sont également appelées « muco-sécrétantes » ou cellules de Goblet (Figure 3b). Elles ont une prévalence croissante dans le TD en suivant un gradient rostro-caudal. Elles sont responsables de la production de la première ligne de défense de la BEI : le mucus (Johansson *et al.* 2011). Les mucines constituant le mucus sont stockées dans des granules intracellulaires que les cellules caliciformes peuvent déverser dans la lumière intestinale par exocytose. Des études ont montré que les souris déficientes en MUC2 développent des colites qui peuvent même conduire à des cancers colorectaux (Van der Sluis *et al.* 2006; Velcich *et al.* 2002). Ces cellules jouent donc un rôle particulièrement important dans le maintien de la BEI.

2.4.4. Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines représentent 1% de la population cellulaire de l'épithélium intestinal (Figure 3b). Elles sont dispersées tout au long du TD et se retrouvent principalement à la base des villosités ou au niveau des glandes. Elles constituent l'organe endocrinien le plus important de l'organisme en termes de taille. Les cellules entéroendocrines comportent des microvillosités qui leur servent de détecteur et leur permettent de goûter le contenu luminal. En réponse aux stimuli intra-luminaux qu'elles détectent, elles produisent et sécrètent de nombreuses hormones et molécules de signalisation ce qui permet de différencier différents types de cellules entéroendocrines. Parmi ces molécules on distingue la gastrine (cellules G), la gréline (cellules P ou X), la somatostatine (cellules D), la cholécystokinine (CCK) (cellules I), la sérotonine (5-HT) (cellules entérochromaffines), le peptide insulino-tropique dépendant du glucose (GIP ; *Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*) (cellules K), le GLP (*Glucagon Like Peptide*) et le peptide YY (cellules L) (Sternini *et al.* 2008). Les produits de sécrétion des cellules entéroendocrines s'accumulent dans des granules intracellulaires et sont sécrétés par exocytose au niveau de la membrane basolatérale dans l'espace interstitiel où ils peuvent agir localement ou à distance en passant dans la circulation sanguine. Ainsi la CCK par exemple est sécrétée en réponse à la prise d'un repas. Sa libération est commandée par la présence des produits de dégradation des lipides et des protéines. La CCK agit sur le pancréas pour induire la sécrétion d'enzymes digestives dans la lumière intestinale et sur la vésicule biliaire pour induire la libération des sels biliaires (Furness *et al.* 1999; Mawe 1991).

2.4.5. Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth résident principalement à la base des cryptes de l'intestin grêle et peuvent occasionnellement être retrouvées dans l'estomac et le côlon (Figure 3b). Contrairement aux autres CEI qui ont une durée de vie plutôt courte (de l'ordre de 3 à 5 jours) les cellules de Paneth vivent environ 30 jours (Clevers and Bevins 2013). Leur fonction principale est de produire, exporter et sécréter une large variété de peptides antimicrobiens. Elles sont de véritables petites usines contenant un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi particulièrement développés. Les différents peptides anti-microbiens produits sont stockés dans des granules dont l'abondance est caractéristique des cellules de Paneth. La composition des granules peut varier en fonction des conditions qui règnent dans la lumière intestinale puisque l'expression de certains peptides anti-microbiens comme Reg III est inductible alors que d'autres comme les alpha-défensines ou les lysozymes sont exprimés de façon constitutive (Bevins and Salzman 2011).

2.5. Composants moléculaires de la BEI

2.5.1. Généralités

Comme évoqué précédemment, l'épithélium intestinal permet le passage des nutriments, de l'eau et des électrolytes tout en empêchant le passage des bactéries pathogènes et des substances toxiques. Les CEI permettent cette perméabilité sélective par 2 passages : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire. La voie transcellulaire est impliquée dans l'absorption et le transport des nutriments comme les sucres, les acides aminés, les vitamines, les acides gras, les minéraux et les peptides. La membrane cellulaire étant imperméable, ce passage se fait via l'utilisation de transporteurs et de canaux localisés sur les membranes apicales et basolatérales des CEI. La voie paracellulaire est associée au transport des molécules dans l'espace intercellulaire qui se trouve entre les cellules épithéliales adjacentes. Elle est régulée par le complexe jonctionnel apical qui est composé des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (Figure 4) (Turner 2009). Le complexe jonctionnel est entouré d'un anneau d'actino-myosine qui permet de réguler l'ouverture et la fermeture de la jonction et ainsi de moduler la perméabilité paracellulaire.

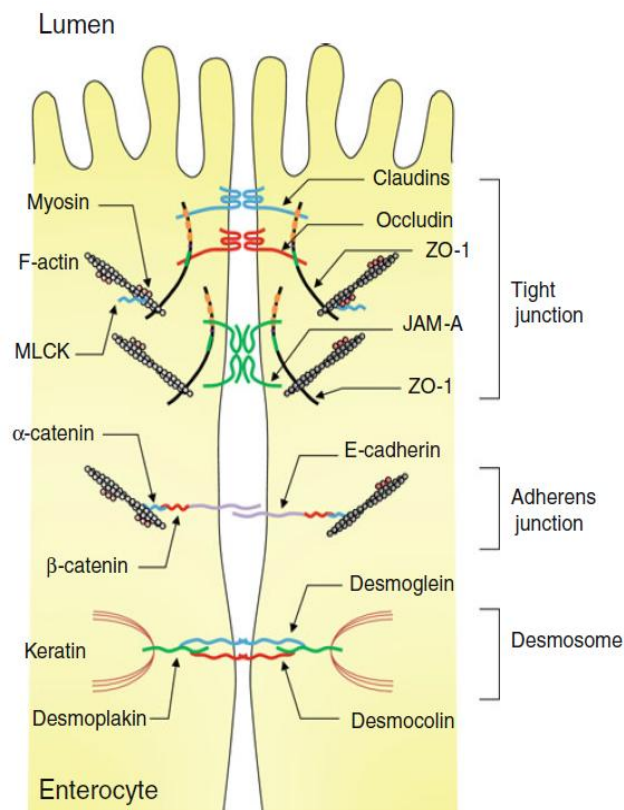


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation du complexe jonctionnel apical avec la jonction serrée, la jonction adhérente et le desmosome. Tiré de (Suzuki 2013).

2.5.2. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont elles mêmes des complexes protéiques localisés sur la membrane latérale du pôle apical des CEI. Elles sont organisées à partir d'un grand nombre de protéines et de molécules de signalisation. On y retrouve principalement 2 protéines transmembranaires qui sont l'occludine et les claudines (Figure 4) (Furuse *et al.* 1993; Furuse *et al.* 1998). Les domaines extracellulaires de ces protéines interagissent avec des protéines cytosoliques dont les principales sont les zonula-occludens (ZO), lesquelles permettent la liaison de la jonction serrée à l'anneau d'actino-myosine. Cette interaction avec le cytosquelette d'actine est importante car elle assure le maintien de l'intégrité de la jonction serrée et lui permet d'assurer sa fonction régulatrice de la perméabilité paracellulaire par contraction et tension de l'anneau d'actino-myosine. L'activité de l'anneau d'actino-myosine est régulée par la phosphorylation et la déphosphorylation de la MLC (*Myosin Light Chain*) par la MLCK (MLC kinase) et par la kinase ROCK (*Rho-associated Kinase*) (Madara *et al.* 1987), la phosphorylation induisant la contraction et donc l'ouverture de la voie paracellulaire.

Le premier constituant protéique transmembranaire des jonctions serrées a été identifié en 1993 : il s'agit de l'occludine (Furuse *et al.* 1993). C'est une protéine d'environ 65kDa avec 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire. Les extrémités amino-terminale et carboxy-terminale sont orientées dans le cytoplasme. L'extrémité carboxy-terminale permet l'interaction avec les protéines ZO afin d'établir un contact avec le cytosquelette (Suzuki 2013). L'occludine interagit également de façon homophile avec les cellules adjacentes pour réguler la perméabilité des macromolécules mais pas des ions qui sont de plus petite taille. Son activité et sa localisation subcellulaire sont régulées par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation ; la déphosphorylation de l'occludine induisant la désorganisation des jonctions serrées (Suzuki *et al.* 2009).

Les claudines quant à elles sont des protéines légèrement plus petites (de 20 à 27kDa). Elles comportent 2 boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire et les domaines amino- et carboxy-terminaux sont également cytoplasmiques. Il existe 24 isoformes de claudines dont l'expression varie selon les segments intestinaux. Les claudines interagissent de manière homophile mais également hétérophile avec les CEI adjacentes. Ces interactions créent soit une barrière, soit des pores sélectifs pour le passage paracellulaire de certaines molécules. L'extrémité carboxy-terminale permet l'association avec les protéines ZO afin d'établir un contact avec le cytosquelette (Suzuki 2013). Les claudines jouent un rôle critique dans la formation des barrières physiologiques. Des études

ont montré que les souris claudine-1^{-/-} meurent en 24h après la naissance à cause de fuites importantes de fluides et d'électrolytes au niveau de la barrière épidermique (Furuse *et al.* 2002). De la même manière que pour l'occludine, la localisation et la fonction des claudines sont régulées par leur niveau de phosphorylation.

Les protéines ZO sont également importantes dans le fonctionnement des jonctions serrées. Il en existe 3 types avec différents poids moléculaires : ZO-1 (220kDa), ZO-2 (160kDa) et ZO-3 (130kDa). Elles jouent un rôle important dans le fonctionnement des jonctions serrées de part leur interaction avec de nombreuses protéines incluant notamment l'occludine, les claudines et également le cytosquelette d'actine et permettent ainsi de transmettre les effets de la contraction de l'anneau d'actino-myosine aux protéines transmembranaires des jonctions serrées (Turner 2009).

Parmi les autres acteurs des jonctions serrées on retrouve également les protéines JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) et la tricelluline (Martin-Padura *et al.* 1998; Ikenouchi *et al.* 2005). Les protéines JAM sont caractérisées par la présence de 2 domaines extracellulaires et d'un seul domaine transcellulaire. Le domaine carboxy-terminal de ces protéines est intracellulaire et permet l'interaction avec ZO-1. Le domaine amino-terminal quant à lui est extracellulaire et peut, dans le cas de la protéine CAR (pour *Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*, qui fait parti de la famille des JAM), interagir hétérophiliquement avec les virus coxsackie et les adénovirus ce qui permet de limiter leur invasion (Bergelson *et al.* 1997). La tricelluline est une protéine de 64kDa qui intervient dans la jonction entre 3 cellules adjacentes même si on peut la retrouver dans des jonctions bicellulaires. Elle comporte une boucle intracellulaire et 3 boucles extracellulaires avec ses extrémités amino- et carboxy-terminales localisées dans le cytoplasme (Suzuki 2013). La localisation de cette protéine lui permet de réguler le passage aussi bien des macromolécules que des ions au niveau des jonctions tricellulaires (Ikenouchi *et al.* 2005).

2.5.3. Les jonctions adhérentes et les desmosomes

Les jonctions adhérentes et les desmosomes procurent une cohésion forte entre les CEI adjacentes et donnent une résistance mécanique importante à l'épithélium intestinal. Ce sont des zones de communication intercellulaire mais qui n'interviennent pas dans la régulation de la perméabilité paracellulaire. Les jonctions adhérentes sont des complexes multiprotéiques composés de la protéine transmembranaire E-cadhérine et des protéines intracellulaires caténines α , β et p120 qui permettent de relier les jonctions adhérentes aux filaments d'actine du cytosquelette. Elles sont localisées directement sous les jonctions

serrées et sont nécessaires à l'assemblage de ces dernières (Capaldo and Macara 2007). Les desmosomes sont aussi des complexes jonctionnels composés de plusieurs protéines (notamment la desmoplakine, la desmogléine et la desmocolline) qui sont cette fois-ci connectés aux filaments intermédiaires de kératine par interaction avec la desmoplakine (Neunlist *et al.* 2013).

2.6. Homéostasie de la BEI

La BEI est une structure dynamique. Elle est continuellement renouvelée par un processus impliquant prolifération, différenciation et migration de cellules souches issues des cryptes. La migration des CEI se fait selon l'axe crypte-villosité sauf pour les cellules de Paneth qui restent au fond des cryptes (Figure 5). Lors de la migration, les cellules cessent leur prolifération et acquièrent les fonctions différenciées que nous avons exposées précédemment. Le renouvellement perpétuel de l'épithélium intestinal et le maintien de son intégrité fait intervenir un équilibre entre plusieurs cascades de signalisation : les trois voies, Wnt/ β -caténine (prolifération et maintien des cryptes), TGF- β /BMP (inhibition de la prolifération et induction de la différenciation) (TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta* ; BMP : *Bone Morphogenetic Protein*) et Hedgehog (prolifération, réparation, action anti-inflammatoire) maintiennent l'architecture des cryptes et des villosités tandis que les deux voies, Notch (prolifération et inhibition de la différenciation) et Hippo (inhibition de la prolifération et apoptose) contrôlent le destin des CSEI (Jeon *et al.* 2013).

Cependant le renouvellement continu de la surface de l'épithélium, représente un site potentiel d'altération de la barrière car il requiert l'exfoliation des CEI en fin de vie. Heureusement il existe un processus, bien que complexe, qui permet le maintien de la BEI pendant l'exfoliation cellulaire (Figure 6). Ce processus nécessite un trafic membranaire qui permet la redistribution des protéines de jonction serrées ZO-1 et occludine au niveau des membranes latérales de la cellule qui s'exfolie. Ces protéines forment ensuite un entonnoir autour de la cellule qui permet de préserver l'étanchéité du système. Les claudines ainsi que la E-cadhérine, l'actine, la myosine II, ROCK et la MLCK interviennent également pour former cet entonnoir. Une activité motrice via la myosine et les microtubules ainsi que l'activation de caspases sont requises pour l'initiation de l'exfoliation (Marchiando *et al.* 2011).

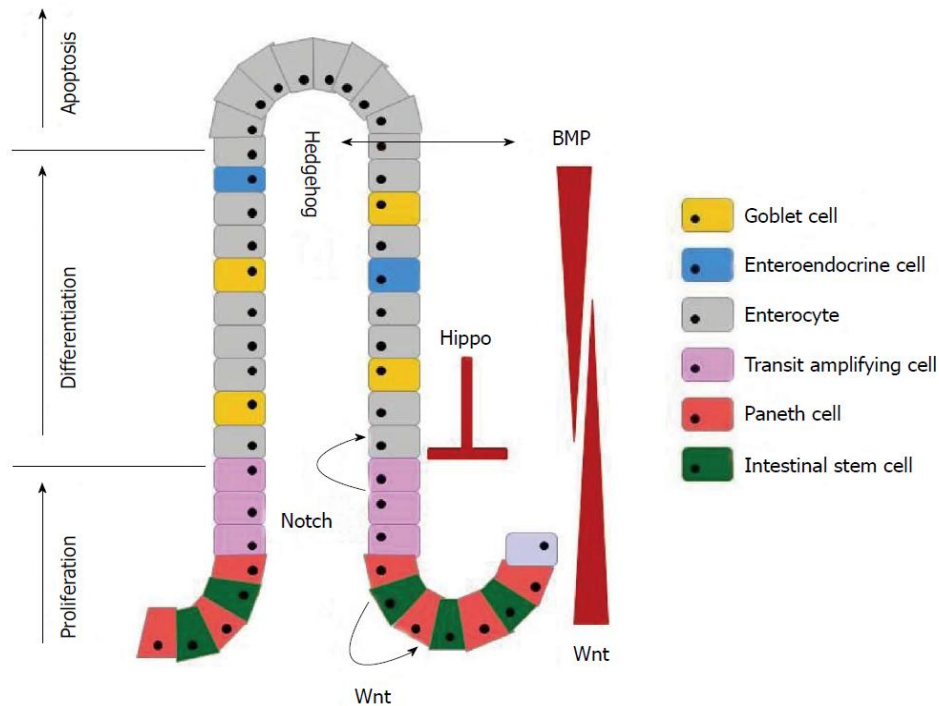


Figure 5: Représentation schématique des différents compartiments de prolifération et de différenciation d'une crypte intestinale avec les voies de signalisations cellulaires impliquées. Tiré de (Jeon et al. 2013).

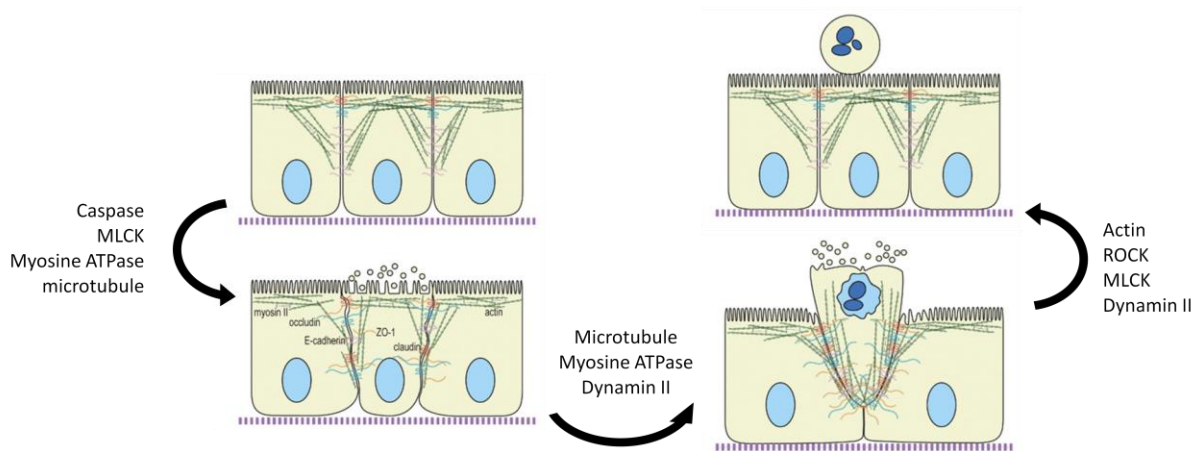


Figure 6: Représentation schématique du processus d'exfoliation proposé adapté de (Marchiando et al. 2011).

En dehors de ce renouvellement, il arrive que la BEI soit lésée. Dans ce cas, des mécanismes de réparation existent également. La réparation de la muqueuse intestinale se fait alors en trois étapes (Figure 7). L'évènement intervenant aussitôt sur la blessure néoformée dans l'épithélium est la restitution épithéliale. Elle permet de restaurer la continuité de la muqueuse par migration et étalement des CEI viables en bordure de lésion sur la matrice de l'épithélium intestinal. Ensuite viennent la prolifération et la différenciation cellulaire (Taupin and Podolsky 2003).

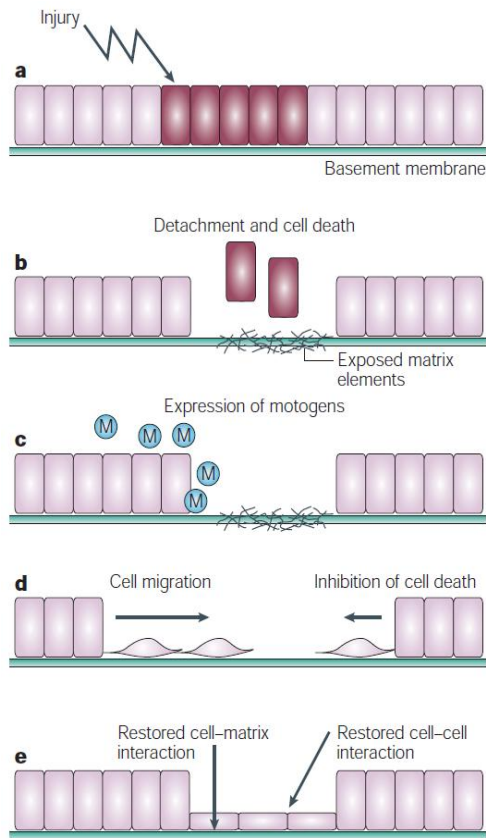


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme de restitution épithéliale lors de la réparation de la BEI. (a) Lésion localisée de la BEI. (b) Détachement et mort des CEI produisant un défaut de continuité de la BEI et une exposition directe de la matrice au contenu luminal. (c) La matrice et les cellules adjacentes à la lésion libèrent des facteurs favorisant la restitution. (d) Etalement et migration des cellules viables entourant la zone lésée et inhibition de la mort des CEI adjacentes. (e) La restauration de la continuité de la BEI et de ses fonctions par le rétablissement des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice. D'après (Taupin and Podolsky 2003).

2.7. La BEI dans les pathologies digestives

De plus en plus d'études suggèrent que des altérations de la BEI ont un rôle central dans l'étiologie et la physiopathologie de nombreuses maladies digestives comme extra-digestives avec le diabète de type I (Vaarala 2008) ou l'autisme (de Magistris *et al.* 2010). Les altérations de la BEI comprennent l'augmentation des perméabilités paracellulaire et transcellulaire ainsi que la baisse des capacités de réparation pouvant mener à un phénomène d'intestin fuyant. Ces modifications sont communes en particulier dans les pathologies inflammatoires digestives comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et le syndrome de l'intestin irritable. Dans une MICI comme la maladie de Crohn par exemple, des augmentations de perméabilité sont observées dans les zones

inflammées tout comme dans les zones non-inflammées (Soderholm *et al.* 2002). Ces modifications peuvent également précéder les phases de rechute inflammatoire (Arnott *et al.* 2000). Les mêmes observations sont faites chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH) (Buning *et al.* 2012). Dans le cadre du syndrome de l'intestin irritable une étude montre une corrélation positive entre l'augmentation de perméabilité observée chez les patients et l'hypersensibilité viscérale (Piche *et al.* 2009). Concernant la réparation de la BEI, des capacités de réparation efficaces corrélerent avec des périodes de rémission plus longues et une diminution de la fréquence des rechutes et du besoin de chirurgie (Flynn and Kane 2011). Ainsi il serait intéressant de développer des approches pour renforcer la BEI en rétablissant ses fonctions de perméabilité et ses capacités de réparation.

3. Les neurones entériques

Les ganglions nerveux entériques contiennent une vingtaine de sous-types distincts de neurones. Ceux-ci diffèrent de part leur morphologie (Figure 8), leurs fonctions, leurs neurotransmetteurs et leurs propriétés électrophysiologiques (Furness 2000). De nombreuses molécules neurotrophiques, morphogènes ainsi que des facteurs de transcription influencent le devenir des neurones entériques (tableau 1). Cependant, les mécanismes déterminant les sous-types de neurones entériques sont encore mal connus. En termes de fonctionnalité on distingue cependant trois grands groupes de neurones entériques : les neurones moteurs, les neurones afférents primaires sensitifs intrinsèques et les interneurones (Figure 9).

Tableau 1 : particularité des sous-types neuronaux (adaptation du tableau 1 (Avetisyan et al. 2015))

Molécules	Effets
GDNF	Augmentation du nombre de neurones nNOS+ ; pas de changement du nombre de neurones ChAT
RET	Plus grosse perte de neurones NOS que des autres neurones dans l'œsophage Perte importante de neurones NOS dans le côlon
BMP	Augmentation des neurones TrkC+, NT3+, nNOS+
NT3	Baisse du nombre de neurones, préférentiellement les neurones CGRP+ sous muqueux
EDN3	Augmentation de la proportion des neurones nNOS+, VIP+ ; baisse de la proportion de neurones ChAT+ ; changements région-spécifiques dans les proportions de neurones Substance P+, NPY+, galanin+, PACAP+ et VIP+
ASCL1/MASH1	Baisse du nombre de neurones ; réduction du nombre de neurones dans l'œsophage ; perte de neurones TC+ ; perte de neurones 5-HT+
HAND2	Perte ou baisse de neurones nNOS/VIP+, baisse des neurones ChAT+, calretinine+, DAT+
5-HT	Diminution des neurones GABA+, DAT+
NET	Diminution des neurones 5-HT+, calretinine +

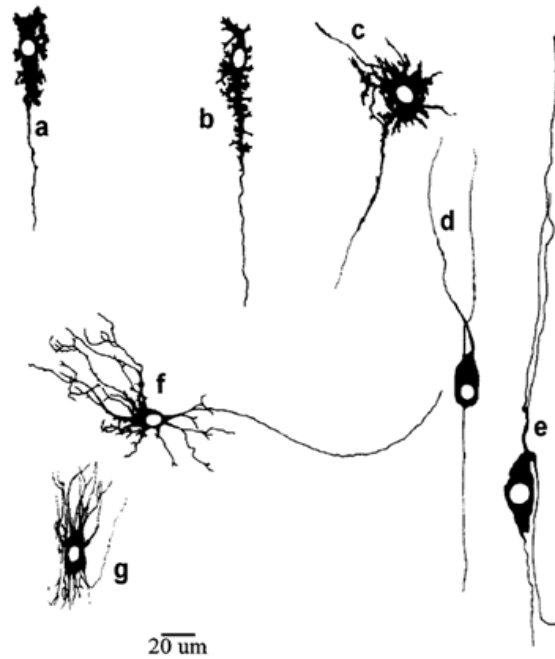


Figure 8 : Représentation schématique des différents types de neurones entériques retrouvés dans le SNE. (a-c) Neurones de type I uniaxonaux multidendritiques (courtes et lamellaires). (d-e) Neurones de type II adendritiques et pliaxonaux. (f-g) Neurones de type III uniaxonaux multidendritiques voire filamenteux. D'après (Timmermans et al. 1997).

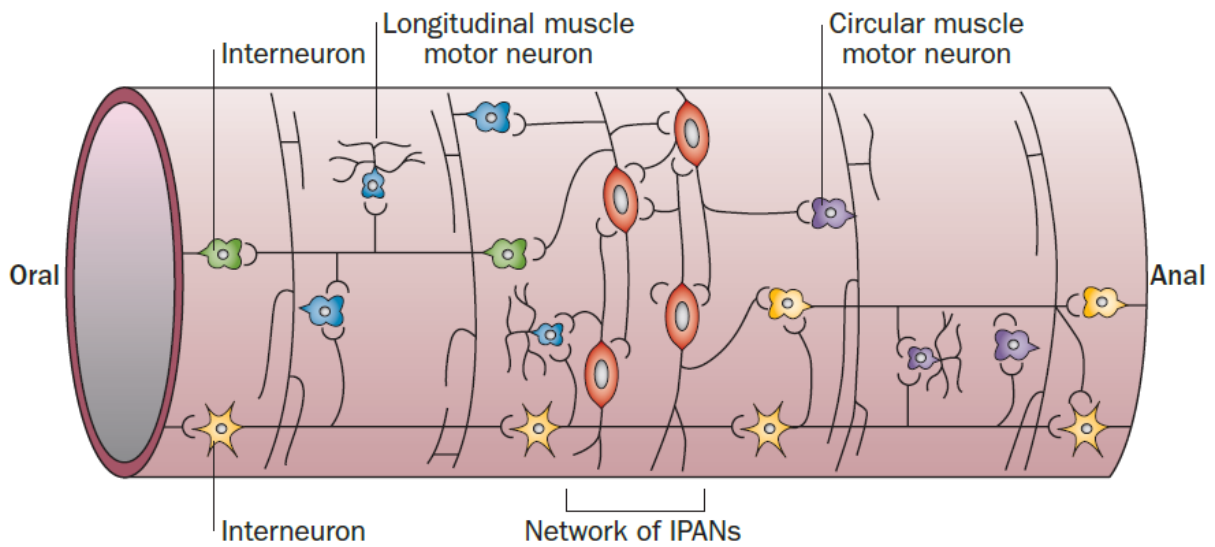


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation des trois grands groupes de neurones entériques dans la paroi intestinale (Furness 2012).

3.1. Les neurones afférents primaires intrinsèques

La manifestation la plus évidente de la présence des neurones senseurs ou neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN ; *Intrinsic Primary Afferent Neuron*) dans le TD est la persistance des réflexes de motricité et de motilité de l'intestin après la séparation des apports nerveux extrinsèques (Langley and Magnus 1904). Bien que ces observations aient été faites au début du XX^{ème} siècle, il a fallu attendre 1992 pour que ces neurones soient mis en évidence (Kirchgessner *et al.* 1992). Les IPANs ont de multiples prolongements ce qui leur donnent une morphologie de type Dogiel II. Ils détectent les changements chimiques de la lumière intestinale, les distorsions mécaniques de la muqueuse épithéliale et les distorsions mécaniques de la musculature de la paroi intestinale. Ils analysent ces informations et transmettent leur réponse aux autres neurones du SNE pour initier une réaction fonctionnelle du TD.

3.2. Les interneurones

Les interneurones sont responsables de l'intégration de l'information provenant des neurones senseurs et transmettent cette information aux neurones moteurs. Il existe un type d'interneurone ascendant et trois types d'interneurones descendants. Ces neurones ont en commun d'exprimer l'acétylcholine (ACh) et d'être organisés en chaîne le long du TD dans le sens oral pour les neurones ascendants et dans le sens anal pour les neurones descendants (Figure 9). Parmi ces derniers on distingue 3 types de neurones. Le premier type de neurone exprime également la NOS (oxyde nitrique synthase) et le peptide vasoactif intestinal (VIP) et est impliqué dans la motilité locale réflexe du TD. Le deuxième type exprime lui la somatostatine et est impliqué dans la conduction du complexe moteur (myoélectrique) migrant. Le troisième type exprime la 5-HT et n'intervient pas directement dans les réflexes de motilité mais plutôt dans les réflexes sécrétomoteurs.

3.3. Les neurones moteurs

On retrouve cinq types de neurones moteurs : les neurones excitateurs du muscle intestinal, les neurones inhibiteurs du muscle intestinal, les neurones sécrétomoteurs-vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs qui ne sont pas vasodilatateurs et les neurones qui innervent les cellules endocrines de l'estomac (Furness *et al.* 2000).

Toutes les régions du TD reçoivent une innervation motrice excitatrice et inhibitrice au niveau du muscle longitudinal externe, du muscle circulaire interne et de la *muscularis mucosae*. L'ACh et les tachykinines sont les principaux neurotransmetteurs des neurones excitateurs. Les neurones inhibiteurs quant à eux comportent la NOS permettant la

production de monoxyde d'azote (NO) et synthétisent également le VIP ainsi que le peptide activateur de l'adénylyl cyclase pituitaire (PACAP) (Furness 2000) (Figure 10).

La balance entre l'absorption et la sécrétion d'eau et d'électrolytes doit être contrôlée en relation avec les besoins locaux et avec les besoins de tout l'organisme. Les neurones sécrétomoteurs innervent la muqueuse. Certains de ces neurones innervent également les artérioles présentes dans la sous-muqueuse, ce qui leur permet de réguler la vasodilatation de ces vaisseaux : ce sont les neurones sécrétomoteurs-vasodilatateurs. Ces deux types de neurones interviennent à travers des circuits réflexes pour accomplir leur contrôle. Ces réflexes sont eux-mêmes contrôlés par le SNC via les voies sympathiques.

3.4. Les fonctions des neurones entériques

3.4.1. Contrôle nerveux de la motricité digestive

Les couches musculaires de la paroi intestinale permettent la propulsion, le mélange du contenu de la lumière et l'expulsion des agents pathogènes ou des substances toxiques. L'importance du SNE dans la coordination des muscles dans ces fonctions varie selon les régions du TD et selon les circonstances physiologiques. Les mouvements de l'œsophage par exemple sont largement dominés par le tronc cérébral au niveau du SNC alors que le SNE joue un rôle plus subsidiaire. De même pour l'estomac, le SNC joue un rôle majeur dans le contrôle de l'état de l'estomac, de son volume, de la force de ses contractions et de ses sécrétions acides (Furness 2012). Cependant le SNE règne sur le contrôle de la motricité et de la motilité de l'intestin grêle et du côlon.

On sait depuis plus d'un siècle que le petit intestin continue de fonctionner quand il est isolé du SNC (Bayliss and Starling 1899). On sait maintenant que c'est le SNE qui est responsable de cette indépendance en contrôlant les différentes fonctions du TD et notamment les mouvements importants comme le péristaltisme et la segmentation. La segmentation est caractérisée par des contractions annulaires oscillantes dues à l'activité « pacemaker » des cellules interstitielles de Cajal situées dans la paroi intestinale. Elle permet le mélange du bol alimentaire avec les sécrétions digestives et facilite l'absorption des nutriments. Le péristaltisme est l'ensemble des contractions circulaires (permettant d'empêcher le reflux) et longitudinales (permettant la propulsion) qui conduisent le chyme vers l'anus. Le péristaltisme est un réflexe qui peut être initié par un stimulus mécanique (distension ou frottement de la paroi intestinale par le passage du bol alimentaire) ou par un stimulus chimique (variation du pH ou de l'osmolarité et présence d'acides gras ou de lipides). Ces stimuli activent les cellules entéro-endocrines de la muqueuse qui vont sécréter

de la 5-HT. Cette sécrétion active les neurones IPANs qui eux-mêmes libèrent différents neuromédiateurs comme l'ACh, la substance P ou la CGRP (*Calcitonin Gene Related Peptide*). Ces neuromédiateurs activent les interneurons ascendants et descendants. Les interneurons ascendants commandent alors la réponse des neurones moteurs ascendants excitateurs qui se traduit par une contraction du muscle en amont du stimulus de départ. Les interneurons descendants commandent la réponse des neurones moteurs descendants inhibiteurs qui se traduit par une relaxation du muscle en aval (Figure 10) (Furness 2000).

Enfin dans un souci de modulation fonctionnelle ultime, les afférences et efférences du SN autonome qui relie le TD au SNC permettent à ce dernier de régler plus finement l'activité motrice du TD par les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques.

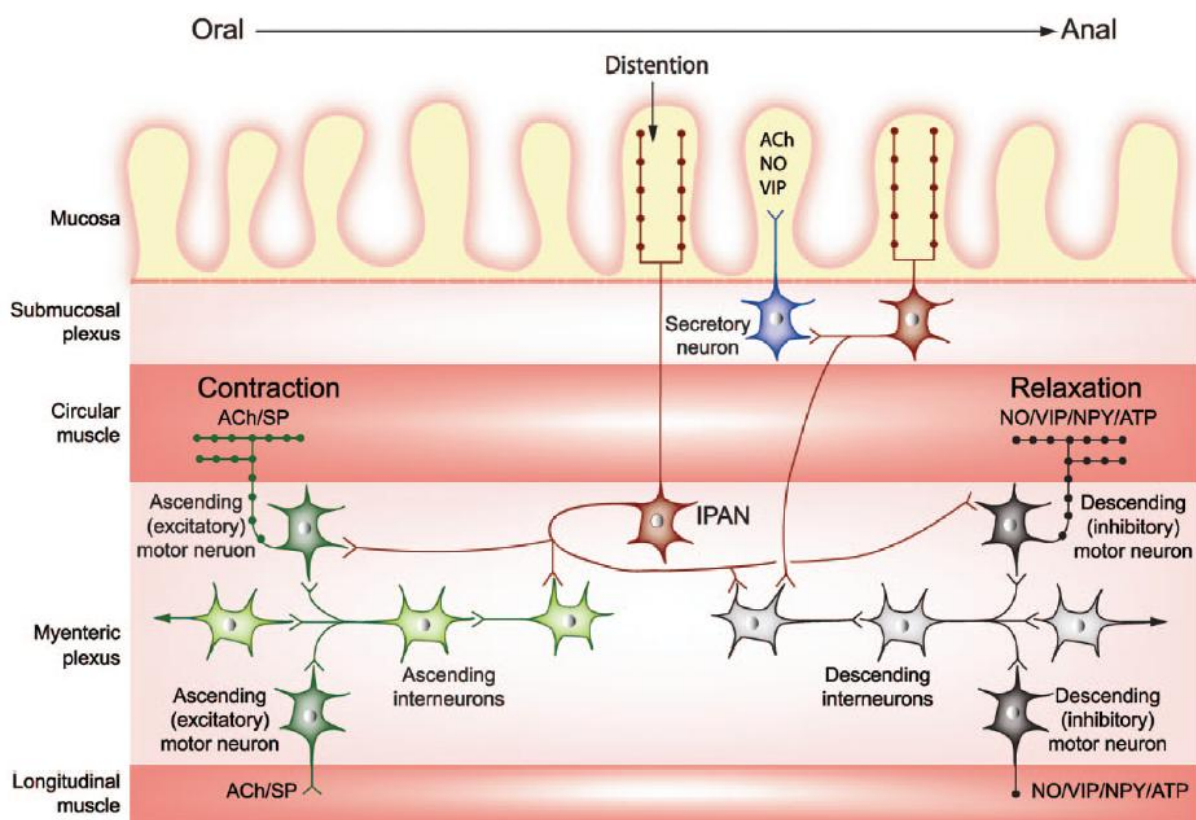


Figure 10.: Représentation schématique des connexions impliquées dans le réflexe local de péristaltisme (Benarroch 2007).

3.4.2. Contrôle nerveux de la sécrétion intestinale (le réflexe sécrétomoteur)

Les sécrétions et absorptions de fluides et d'électrolytes entre le milieu luminal et le milieu intérieur de l'organisme sont elles aussi régulées en partie par le SNE. Le volume qui traverse quotidiennement la BEI représente plus de 2 fois le volume sanguin (Furness 2012),

c'est la raison pour laquelle les altérations du contrôle de ces flux peuvent avoir des conséquences très importantes sur l'organisme. Encore une fois des mécanismes réflexes interviennent ici pour réguler le passage de l'eau et des électrolytes depuis le milieu extracellulaire de la *lamina propria* vers le lumen (Figure 11).

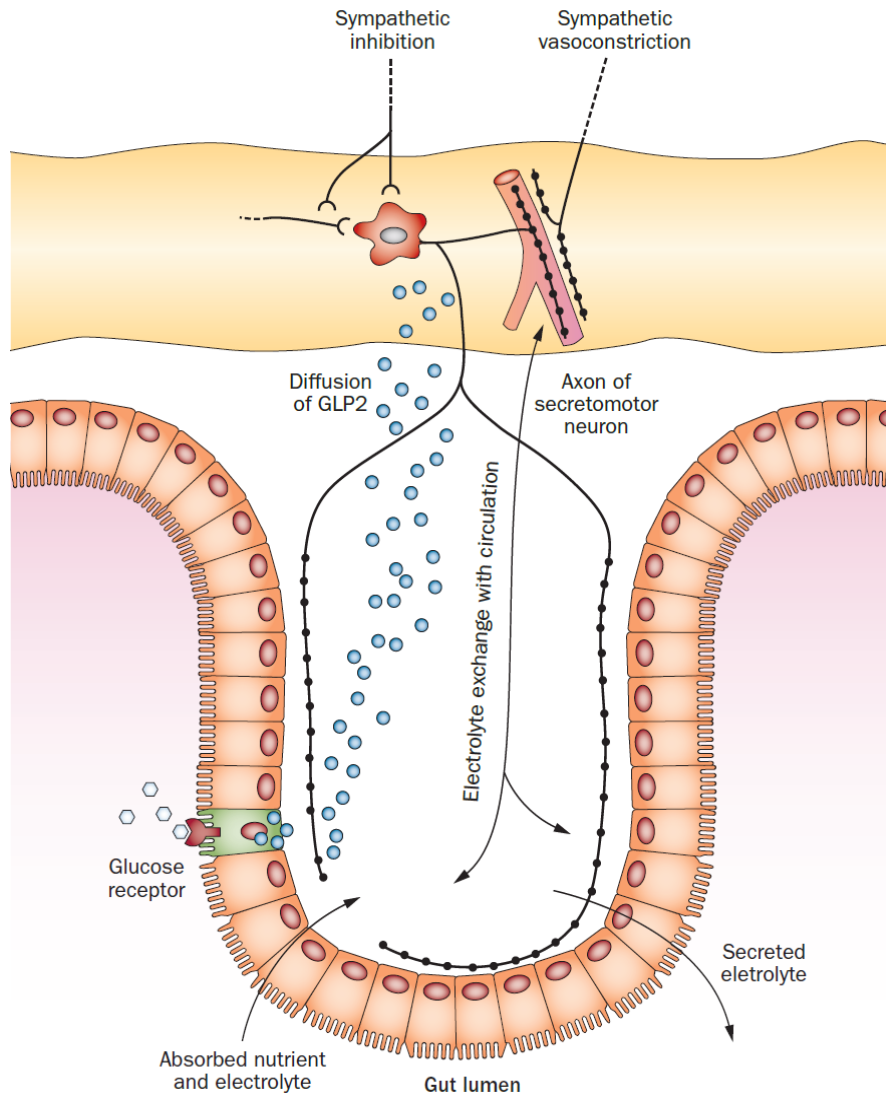


Figure 11 : Représentation schématique du contrôle neuronal sur le passage trans-épithéliale de l'eau et des électrolytes dans l'intestin grêle et sur la vasomotricité (Furness 2012).

L'eau et les électrolytes sécrétés proviennent de la circulation sanguine et de l'absorption intestinale. Les réflexes sécrétomoteur et vasodilatateur sont là pour moduler la balance entre l'absorption et la sécrétion d'eau et d'électrolytes de tout l'organisme. Ce contrôle se fait donc à travers les capteurs de la pression sanguine et du volume sanguin et via des interactions avec le système nerveux sympathique qui module la vasoconstriction et l'activité sécrétrice réflexe (Sjövall *et al.* 1986). La distension mécanique appliquée sur la

muqueuse épithéliale intestinale ainsi que les molécules présentes dans la lumière intestinale peuvent servir de stimuli pour induire ces réflexes. Deux types de neurones sécrétomoteurs, les cholinergiques et les non-cholinergiques, ont été identifiés. Les neurones non-cholinergiques contrôlent la majorité du réflexe sécrétomoteur local par la libération de VIP, de substance P, d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) ou de PACAP (Reddix *et al.* 1994). La stimulation chimique ou mécanique des cellules entéroendocrines induit la libération par celles-ci de 5-HT qui peut également intervenir sur le réflexe. Les neurones IPAN y sont sensibles et peuvent ainsi moduler la réponse sécrétomotrice cholinergique et VIPergique. L'ACh et le VIP libérés vont se lier aux récepteurs présents sur les cellules épithéliales et stimuler la sécrétion d'ions Cl⁻ et d'eau (Cooke 2000) (Figure 11).

Un stimulus important de la sécrétion est le transport actif de nutriments comme le glucose par exemple. Le récepteur entérique au glucose est localisé sur des cellules entéroendocrines (Young 2011). L'activation de ces cellules induit la libération de GLP1 et GLP2. Les récepteurs au GLP2 se trouvent sur les neurones sécrétomoteurs non cholinergiques. Le GLP2 active ces récepteurs ce qui donne l'ordre à ces neurones de commander la sécrétion d'eau et d'électrolytes (Figure 11) (Shirazi-Beechey *et al.* 2011).

3.4.3. Contrôle nerveux de la BEI

3.4.3.1. Perméabilité

L'activation des neurones entériques renforce les fonctions de la BEI. Il a été montré en ce sens dans un modèle *in vitro* de culture de sous-muqueuse humaine avec une monocouche de CEI qu'une stimulation électrique du SNE présent réduit la perméabilité paracellulaire (Neunlist *et al.* 2003). De plus il a été montré chez le cochon qu'une stimulation électrique des racines sacrées induit également une diminution de la perméabilité paracellulaire (Meurette *et al.* 2012). Les neuromédiateurs du SNE peuvent avoir des effets différents sur la BEI (Figure 12d). L'ACh augmente à la fois la perméabilité para et transcellulaire (Cameron and Perdue 2007). La substance P peut également augmenter la perméabilité paracellulaire (Hayden and Carey 2000). Le VIP quant à lui renforce la BEI en diminuant la perméabilité. Son effet sur la barrière semble médié par la réduction de l'activité de la MLCK et également par l'augmentation de l'expression de ZO-1 (Neunlist *et al.* 2003).

3.4.3.2. Prolifération des CEI

De la même manière que pour la perméabilité, les neurones entériques ont aussi des effets sur la prolifération et la différenciation des cellules de la BEI qui diffèrent selon les médiateurs impliqués (Figure 12c). Le VIP possède notamment des effets antiprolifératifs sur les CEI (Toumi *et al.* 2003) alors que l'ACh et la substance P ont des effets stimulants sur la prolifération (Cheng *et al.* 2008; Goode *et al.* 2003). Les neurones entériques peuvent aussi produire des endocannabinoïdes qui ont un effet bénéfique sur le processus de cicatrisation de la muqueuse colique (Wright *et al.* 2005).

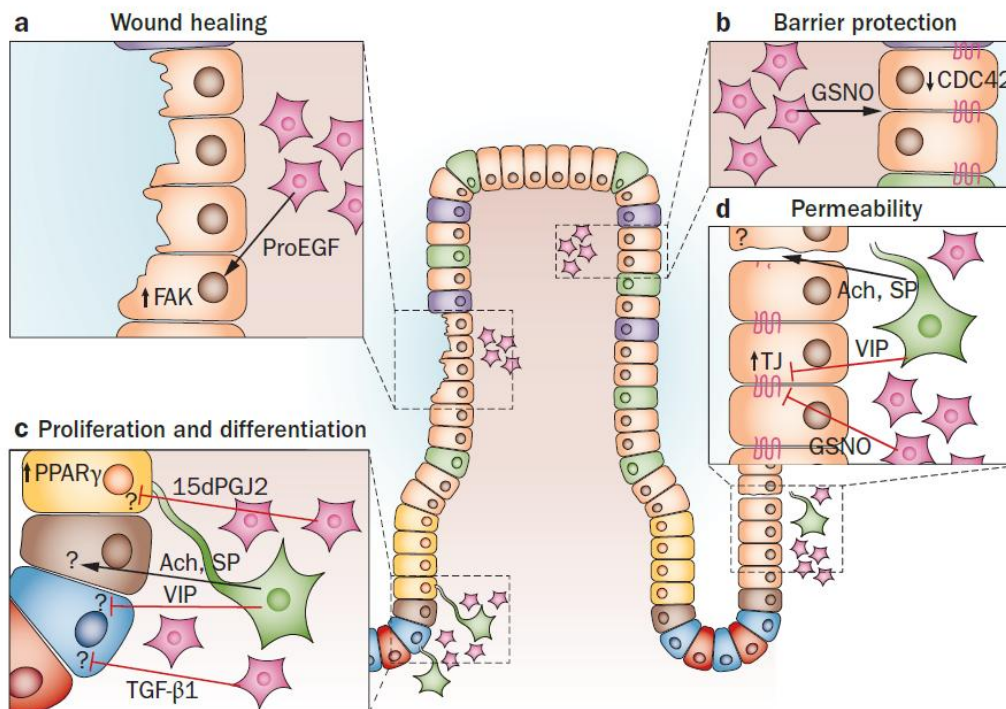


Figure 12: Représentation schématique de la régulation des fonctions de la BEI par les différents acteurs du SNE ainsi que leurs médiateurs (Neunlist *et al.* 2013).

3.5. Le SNE est connecté au SNC

Bien que le SNE soit capable de fonctionner indépendamment du SNC, il est connecté à celui-ci à travers les voies afférentes et efférentes des systèmes nerveux parasympathique et sympathique. Les centres végétatifs diffèrent selon le système : les centres parasympathiques viscéromoteurs destinés au tractus digestif sont situés à la fois dans le tronc cérébral et dans la moelle sacrée (colonne intermédiolatérale de S2 à S4). Les centres sympathiques viscéromoteurs sont localisés dans la colonne intermédiolatérale de la moelle de T1 à L3. Les centres végétatifs contiennent le corps cellulaire du premier

motoneurone viscéral, analogue du premier motoneurone de la motricité somatique, également appelé neurone pré-ganglionnaire.

3.5.1. Voies afférentes

Les neurones afférents primaires qui portent les informations sensorielles au SNC sont localisés dans le nerf splanchnique (sympathique) et le nerf vague (parasymphatique).

Les afférences viscérosensibles sont surtout développées dans le système parasymphatique, où elles constituent le contingent majeur du nerf vague. Dans le tractus digestif, les fibres afférentes du nerf vague innervent la muqueuse, les plexi entériques et la musculature, particulièrement au niveau de l'œsophage et de l'estomac. Ce sont des fibres de petit calibre non (type C) ou faiblement (type A δ) myélinisées. Les neurones sensitifs viscéraux dont elles dépendent répondent aux stimuli mécaniques et chimiques physiologiques (Berthoud and Neuhuber 2000). Leur corps cellulaire se situe dans le cou au niveau du ganglion plexiforme et leur court axone fait synapse dans le noyau du tractus solitaire de la moelle allongée. Ces neurones initient plusieurs réflexes vago-vagaux affectant la déglutition, la motilité intestinale et les sécrétions.

Dans le système sympathique, les neurones sensitifs viscéraux possèdent des fibres de type C et véhiculent avant tout les stimuli nociceptifs déclenchés par une variété de médiateurs inflammatoires. Leur corps cellulaire se situe dans le ganglion rachidien de la racine dorsale de la moelle et leur court axone fait synapse dans la couche V de la corne dorsale, où une convergence avec les afférences somatiques explique le phénomène des douleurs projetées d'origine viscérale (Mei 1985). Les neuromédiateurs sont des neuropeptides (CGRP, VIP, somatostatine, dynorphine) incluant la famille des tachykinines (substance P, neurokinine A).

3.5.2. Voies efférentes

Les voies efférentes motrices parasymphatiques comportent le nerf vague qui contrôle les fonctions motrices et sécrétomotrices des parties supérieures du TD, et le nerf sacré qui régule les fonctions du côlon distal et du rectum (Kirchgessner and Gershon 1989). L'innervation efférente vagale supérieure a pour origine le noyau moteur dorsal du nerf vague et le noyau ambigu (Hopkins *et al.* 1996). Le noyau ambigu contient les neurones somatomoteurs non autonomes qui innervent les muscles striés du larynx, du pharynx et de l'œsophage. Le noyau moteur dorsal du nerf vague contient les neurones pré-ganglionnaires

viscéromoteurs qui innervent les plexus myentérique et sous-muqueux du SNE et font donc synapse avec les neurones post-ganglionnaires directement à proximité des organes concernés (Hopkins *et al.* 1996; Walter *et al.* 2009).

Pour les fibres sympathiques qui innervent l'intestin, le corps du neurone ganglionnaire est situé à distance, dans la corne intermedio-latérale de la moelle épinière. Ces fibres établissent leur synapse dans les ganglions des chaînes paravertébrale et prévertébrale. Trois ganglions prévertébraux, reliés à la chaîne paravertébrale par l'intermédiaire des nerfs splanchniques, assurent l'innervation sympathique des organes sous-diaphragmatiques : le ganglion coeliaque, le ganglion mésentérique supérieur et le ganglion mésentérique inférieur.

4. La glie entérique

4.1. Place de la glie entérique dans le SNE

Il est désormais bien établi que la glie entérique joue un rôle important dans le fonctionnement du SNE et du TD. Les cellules gliales entériques (CGE) ont longtemps été considérées comme ayant un rôle passif de soutien des neurones entériques (Gulbransen and Sharkey 2012). Il est désormais bien établi qu'elles ont un rôle actif dans la physiologie du SNE et possiblement dans la physiopathologie de certaines pathologies digestives et extra-digestives (Gulbransen and Sharkey 2012; Neunlist *et al.* 2013; Neunlist *et al.* 2014). Les CGE sont présentes aussi bien dans le plexus myentérique que dans le plexus sous muqueux ou encore directement dans la *lamina propria* de la muqueuse intestinale au plus proche de l'épithélium, colonisant à la fois les contours des cryptes, des villosités et des vaisseaux sanguins (Figure 13) (Liu *et al.* 2013b). Les cellules gliales du SNE ont été observées pour la première fois à la fin du XIXème siècle par Dogiel. Il faut cependant attendre 1972 pour qu'elles soient identifiées comme un type cellulaire unique et individualisable qui rentre en contact direct avec les neurones entériques pour former les jonctions neurogliales (Gabella 1972). Au début des années 80, il a été montré que les CGE exprimaient les marqueurs astrocytaires GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) et la protéine S100 β (S100 Ca²⁺ binding protein β), permettant d'envisager les CGE comme les équivalents digestifs des astrocytes du SNC. Ces données morphologiques ont depuis été renforcées par l'existence de similitudes fonctionnelles entre CGE et astrocytes (Sharkey 2015). On peut différencier morphologiquement 4 classes de CGE. Les CGE en forme d'étoile qui sont intra-ganglionnaires (le type I), les CGE inter-ganglionnaires qui sont

allongées (le type II), les CGE de la muqueuse (le type III) et les CGE intra-musculaires (le type IV) (Figure 14) (Gulbransen and Sharkey 2012).

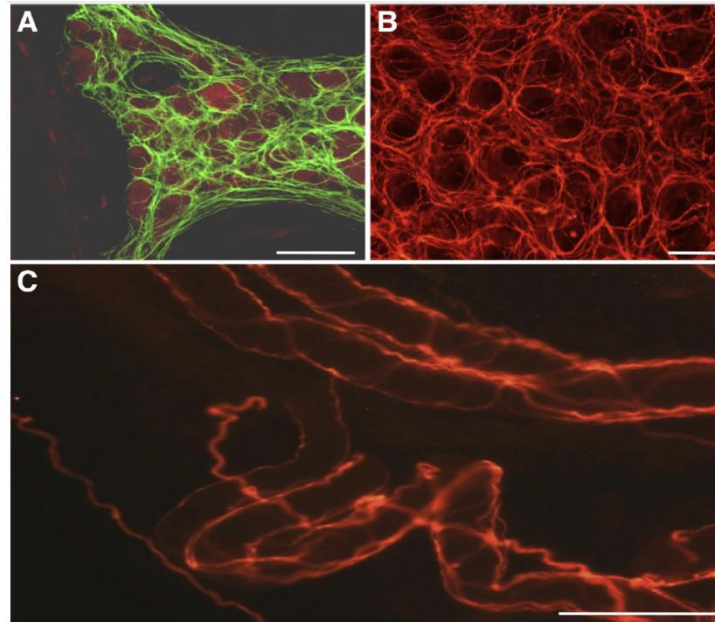


Figure 13 : Répartition des CGE dans les différentes couches de la paroi intestinale. (A) Marquage immunohistochimique des CGE dans un ganglion myentérique de l'intestin grêle chez le rat (GFAP pour les CGE en vert, HuC/D pour les neurones entériques en rouge). (B) Organisation du réseau glial au plus près des cryptes dans la muqueuse colique chez l'homme (S100 β en rouge). (C) CGE se développant le long de capillaires sanguins (S100 β en rouge) Barre d'échelle = 50 μ m. D'après (Neunlist et al. 2014).

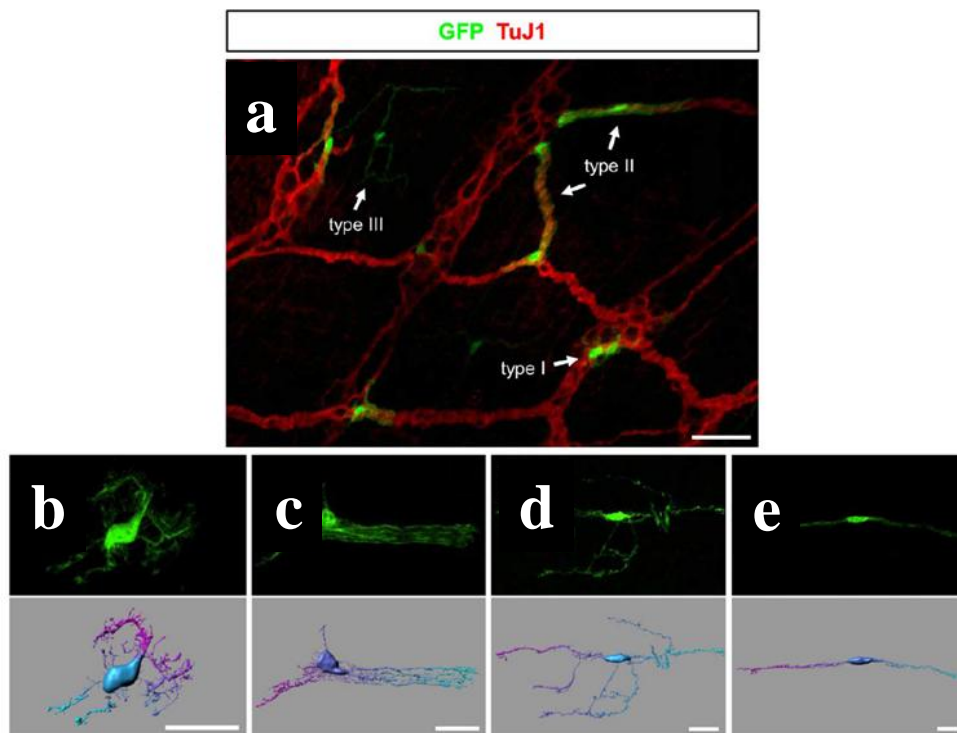


Figure 14 : Marquage des CGE dans les souris Sox10Cre/MADM exprimant la GFAP (vert). Adapté de (Boesmans et al. 2015).

4.2. Les marqueurs des CGE

Alors que la première description des CGE par Dogiel en 1899 était basée sur une préparation au bleu de méthylène, des techniques d'immunohistochimie plus récentes ont révélé que les CGE présentent de nombreux marqueurs en commun avec les astrocytes du SNC. On retrouve ainsi parmi les filaments intermédiaires de leur cytosquelette la GFAP ainsi que la vimentine (Jessen and Mirsky 1980; Jessen and Mirsky 1983). La protéine S100 β est également exprimée par les CGE (Ferri *et al.* 1982). D'autres marqueurs ont ensuite été décrits, comme la glutamine synthétase (Jessen and Mirsky 1983), la protéine Ran-2 (*Rat neural antigen-2*) (Jessen and Mirsky 1985), le récepteur p75 et le facteur de transcription Sox10 (Young *et al.* 2003).

Les CGE présentent de nombreuses similitudes avec les astrocytes et n'ont rien en commun avec les cellules microgliales du SNC. Les cellules de la microglie ont une origine embryologique mésodermale de la lignée des monocytes/macrophages alors que les CGE proviennent du neurectoderme. La microglie du SNC exprime des marqueurs des monocytes/macrophages alors que dans le SNE, ces marqueurs sont exclusivement

exprimés par des macrophages résidents à proximité des plexus entériques (Rühl *et al.* 2005).

Dans le TD, la GFAP est considérée comme un marqueur spécifique des CGE alors que la vimentine qu'elles expriment est aussi présente dans les myofibroblastes (Rühl *et al.* 2001). Dans le SNC, les niveaux d'expression de la GFAP sont modulés par la différenciation des astrocytes, l'inflammation ou encore les lésions. Dans le système nerveux périphérique (SNP), des lésions nerveuses induisent une augmentation d'expression de la GFAP dans les cellules de Schwann (Jessen and Mirsky 1992). Dans le SNE, il a été rapporté que l'expression de la GFAP augmente durant des épisodes d'inflammations intestinales (Bradley *et al.* 1997). Ces observations indiquent que l'expression de la GFAP est régulée de façon dynamique et reflète l'état fonctionnel d'une cellule gliale.

La protéine S100 β , quant à elle, est localisée dans les cytoplasmes et/ou dans les noyaux d'une large gamme de cellules dans des tissus nerveux et non nerveux. Dans les CGE elle joue un rôle dans l'homéostasie calcique ainsi que dans la régulation du cytosquelette (Donato *et al.* 2013). Dans le SNC, S100 β a une activité neurotrophique, elle peut moduler la prolifération cellulaire et la différenciation et intervient dans la réponse à la neuroinflammation et aux processus neurodégénératifs. Bien que S100 β soit exprimée par différents types cellulaires, au niveau du TD elle est uniquement localisée dans les CGE (Albuerne *et al.* 1998).

Sox10 appartient à la famille des facteurs de transcription Sox. Les facteurs Sox sont impliqués dans des processus de développement comme la squelettogenèse, la neurogenèse, le développement de la crête neurale où ils contrôlent le devenir cellulaire et la différenciation (Bondurand and Sham 2013). Sox10 intervient, entre autre, dans le développement du SNE. Il joue le rôle de facteur de maintenance de multipotence pour les cellules souches de la crête neurale et intervient dans la gliogenèse au niveau du système nerveux périphérique et notamment dans le SNE (Britsch *et al.* 2001).

Une étude récente a corrélié l'expression de ces principaux marqueurs gliaux avec les différents types de CGE identifiés (Boesmans *et al.* 2015). Ainsi, alors que la majorité des CGE de type I résidant dans le plexus myentérique co-expriment la GFAP et S100 β (GFAP⁺/S100 β ⁺ ; 55,8 \pm 5,2%), le reste de cette population exprime soit S100 β (GFAP⁻/S100 β ⁺ ; 29,9 \pm 4,4%), soit la GFAP (GFAP⁺/S100 β ⁻ ; 14,3 \pm 3,9%). Le pourcentage de cellules GFAP⁻/S100 β ⁺ dans les populations de type II et de type III est significativement plus grand (respectivement 59,6 \pm 1,6% et 78,9 \pm 0,7%). Concernant la répartition de Sox10, les auteurs ont trouvé que 74,4 \pm 2,4% des CGE de type I sont GFAP⁺/Sox10⁺ mais seulement 19,3 \pm 1,5% sont GFAP⁻/Sox10⁺. Dans les CGE de type II le pourcentage augmente à 46,4 \pm

3,7% pour les GFAP⁻/Sox10⁺ alors que dans le type III il monte encore jusqu'à $67,6 \pm 5,1\%$. Enfin la quasi-totalité des CGE S100 β ⁺ sont également Sox10⁺ et seule une faible proportion de CGE sont GFAP⁻/S100 β ⁻/Sox10⁺. Il est intéressant de constater qu'aucun de ces marqueurs ne permet d'identifier seul toutes les populations de CGE dans le plexus myentérique (Figure 15).

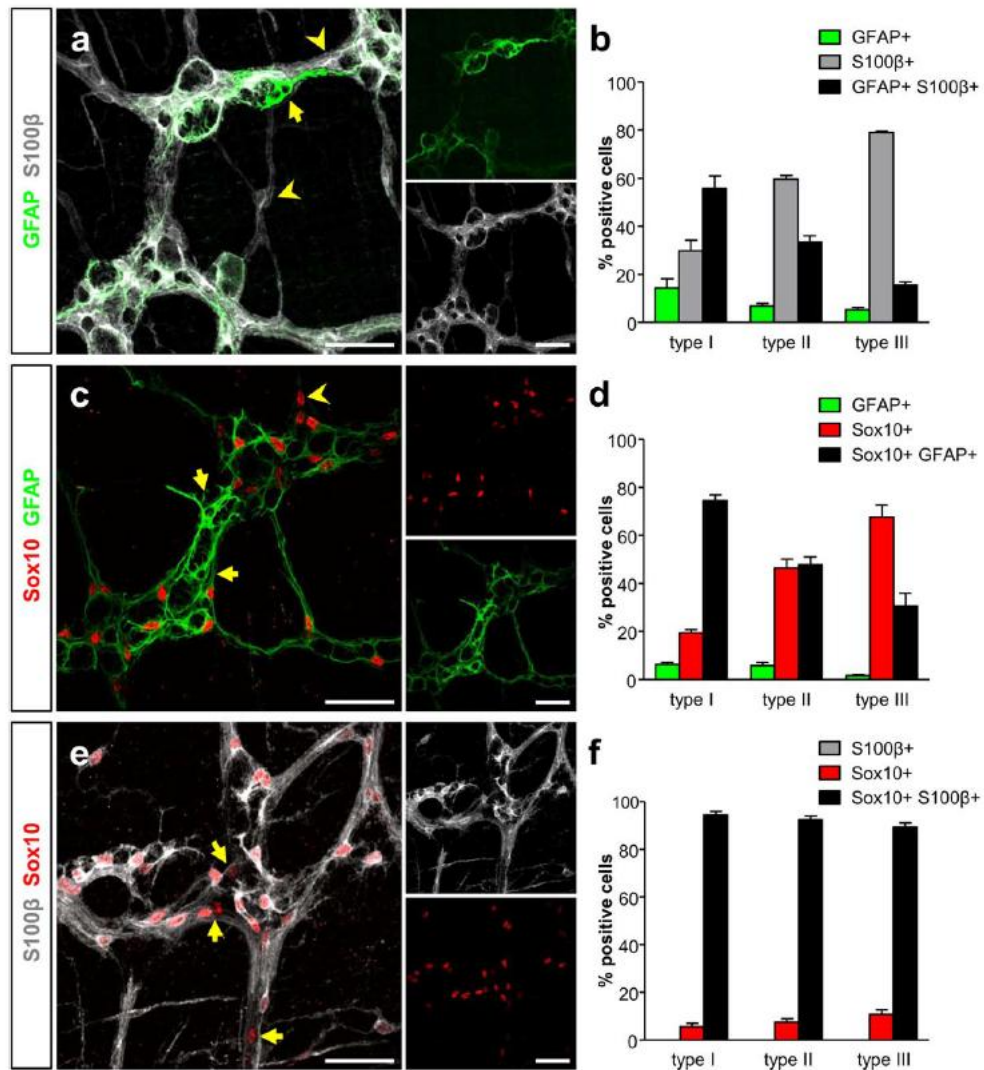


Figure 15: Expression différentielle de la GFAP, de S100B et de Sox10 dans les CGE du plexus myentérique d'iléons de souris (Boesmans et al. 2015).

4.3. La GFAP en particulier

4.3.1. Généralités sur la GFAP

La GFAP est une protéine avec un poids moléculaire d'environ 50kDa. Elle est le marqueur phare des astrocytes dans le SNC si bien que l'on a longtemps pensé qu'elle était

spécifique à ces cellules. Depuis, des études ont mis en évidence la GFAP dans la glie périphérique avec notamment les CGE et les cellules de Schwann. Elle a également été mise en évidence dans d'autres types cellulaires comme les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules myoépithéliales, les lymphocytes et les cellules stellaires hépatiques (Riol *et al.* 1997; Carotti *et al.* 2007). Le rôle de la GFAP, qui est une protéine des filaments intermédiaires (FI), comme protéine de structure des astrocytes est désormais bien établi. Au fil des années, plusieurs études ont également montré que la GFAP était impliquée dans la physiologie astrocytaire en particulier dans la régénération, la plasticité synaptique et la réactivité gliale. Il n'est cependant pas encore identifié si la distribution différentielle de cette protéine des FI a un rôle fonctionnel ou non dans le SNE (Boesmans *et al.* 2015).

La séquence en acides aminés de la GFAP a été présentée pour la première fois en congrès en 1969 (Middeldorp and Hol 2011). Le gène de la GFAP de souris a été cloné pour la première fois en 1984 (Lewis *et al.* 1984). Le gène humain de la GFAP a quant à lui été cloné en 1989 (Reeves *et al.* 1989). La GFAP fait partie de la famille des FI, qui forment le cytosquelette de la plupart de cellules eucaryotes avec les microtubules et les microfilaments. Les FI tirent leur nom de leur forme filamenteuse et leur diamètre intermédiaire (de 8 à 12 nm) entre les microfilaments d'actine (7 nm) et les microtubules de tubuline (25 nm). Les FI sont subdivisés en 6 classes selon leurs homologues de séquence (Szeverenyi *et al.* 2008). La GFAP est classée parmi les FI de type III.

Le gène de la GFAP est localisé sur le chromosome 17q21 et est composé de 9 exons, de 8 introns, de 4 exons alternatifs et de 2 introns alternatifs distribués sur 10 kb d'ADN. Soixante-seize mutations de ce gène ont été rapportées. Elles sont toutes associées à la maladie de Alexander, une maladie génétique touchant les astrocytes (Brenner *et al.* 2001).

4.3.2. Isoformes de la GFAP

Jusqu'à présent, 10 variants d'épissage de la GFAP ont été décrits dans différentes espèces (Kamphuis *et al.* 2014) (Figure 16). Chez l'homme on retrouve l'expression de 8 isoformes dans le SNC sur les 9 qui existent. L'isoforme canonique, la GFAP α , comporte 9 exons. La GFAP β , qui n'a été décrite que chez le rat, présente un site additionnel d'initiation à la transcription en région 5'UTR (Condorelli *et al.* 1999). La GFAP γ ne comporte pas d'exon 1 mais inclut les 126 dernières bases de l'intron 1 (Zelenika *et al.* 1995). Les 4 variants d'épissage GFAP Δ Ex6, GFAP Δ 164, GFAP Δ 135 et GFAP Δ Ex7 présentent des séquences manquantes dans les exons 6 ou 7 (Hol *et al.* 2003). La GFAP ζ est allongée par les 284 dernières bases de l'intron 8 (rapporté par Zelenika *et al.* en 1995 mais son nom « ζ » est plus récent). La GFAP δ et la GFAP κ intègrent les séquences des introns 7 et 8

(Roelofs *et al.* 2005; Blechingberg *et al.* 2007; Nielsen *et al.* 2002). La GFAP κ étant l'isoforme découverte le plus récemment.



*Figure 16 : Représentation schématique des différentes séquences exoniques des isoformes connues de la GFAP (Kamphuis *et al.* 2012).*

4.3.3. Structure de la GFAP

La GFAP est le FI principal dans les astrocytes du SNC. Tous les types de FI ont une structure organisée de la manière suivante :

- Une région amino-terminale (N-term) constituant la « tête » de la protéine.
- Une région centrale hélicoïdale constituant le « corps » de la protéine.
- Une région carboxy-terminale (C-term) formant la « queue » de la protéine.

Les différentes régions de la protéine peuvent intervenir dans la formation des FI. La première étape est l'assemblage en dimères puis en tétramères par enroulement des régions centrales de 2 monomères de GFAP. Ces dimères se positionnent en quinconce et de façon antiparallèle pour former les tétramères. Les régions tête et queue interviennent ensuite pour la formation des proto-filaments. Le FI final contient approximativement 8 proto-filaments (Quinlan *et al.* 1989).

4.3.4. Modifications post-traductionnelles de la GFAP

Les FI sont sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) qui ont d'importantes conséquences sur leur structure. La phosphorylation est une MPT importante des FI puisqu'elle conditionne de façon majeure leur assemblage et désassemblage (Sihag *et al.* 2007). Pour la GFAP, 6 sites de phosphorylation ont été identifiés : la thréonine 7, les sérines 8, 13, 17, 34 au niveau de la tête ainsi que la sérine 389 sur la queue de la protéine (Inagaki *et al.* 1990; Nakamura *et al.* 1992; Sekimata *et al.* 1996; Tsujimura *et al.* 1994). La phosphorylation des sites de la région N-term de la GFAP a un effet négatif sur l'assemblage des filaments. Les formes phosphorylées de la GFAP sont libres tandis que les formes non phosphorylées sont oligomérisées. Ce système de régulation de l'assemblage des FI de GFAP est important pour la redistribution de la GFAP pendant les phases du cycle cellulaire. Ces sites de phosphorylation sont conservés entre les espèces et sont présents sur la majorité des isoformes de la GFAP humaine. La phosphorylation sur la queue de la GFAP paraît également importante puisque cette partie de la protéine est impliquée dans la stabilisation des interactions entre proto-filaments et dans le contrôle de la longueur des FI (Der Perng *et al.* 2006).

La GFAP peut aussi être citrullinée (Nicholas *et al.* 2003). A ce jour les sites identifiés sont les résidus arginines 30, 36, 270, 406 et 416 (Jin *et al.* 2013). Cependant le rôle de la citrullination et la façon dont elle module l'activité de la GFAP ne sont pas encore compris. De même, d'autres MPT comme des acétylations sur des résidus lysines et des glycosylations ont été identifiées mais sans que leur rôle sur la structure et la fonction de la GFAP ne soient établis (Liu *et al.* 2013a; Korolainen *et al.* 2005).

Une autre MPT intéressante de la GFAP est sa troncation. Il a été montré que la GFAP peut être tronquée aux extrémités N-term et C-term par la calpaïne, une protéase à cystéine dont l'activité est dépendante du calcium. Cette troncation conduit à la formation de différents fragments de GFAP de 38 à 44kDa dont le rôle est mal connu. Cependant il est intéressant de noter que ces formes tronquées de GFAP ont été retrouvées *post mortem* dans la moelle épinière de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (Fujita *et al.* 1998) et également *post mortem* dans le cerveau de patients ayant subi un traumatisme crânien (Zhang *et al.* 2014) ainsi que *de vivo* dans du liquide céphalo-rachidien après des lésions de la moelle épinière (chez le rongeur comme chez l'homme) (Yokobori *et al.* 2013). Des données préliminaires du laboratoire ont montré que plusieurs bandes immunoréactives pour la GFAP étaient aussi retrouvées en Western Blot dans le SNE (Lebouvier *et al.* 2010) (Figure 17).

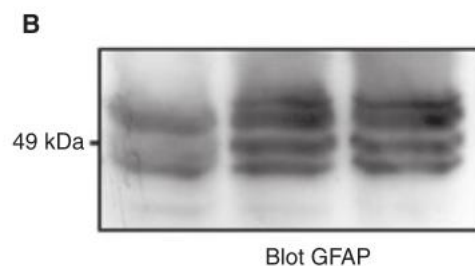


Figure 17: Profil de migration électrophorétique de la GFAP entérique en Western Blot à partir de biopsies coliques humaines (Lebouvier et al. 2010).

La GFAP peut également être tronquée par la caspase 6 qui induit la production d'un fragment C-term d'environ 24kDa et d'un fragment N-term d'environ 26kDa. Le fragment C-term est incapable de reformer des filaments alors que le N-term peut s'assembler mais conduit à la formation d'agrégats filamenteux (Chen *et al.* 2013).

4.3.5. Rôle de la GFAP

L'expression de la GFAP semble être régulée de façon importante étant donné qu'elle peut être induite par une lésion cérébrale ou une maladie et qu'elle peut même fluctuer selon le cycle circadien jour-nuit (Hajós 2008). Comme les autres protéines des FI de type III, son expression permet d'apporter un support mécanique à la membrane plasmique et contribue à la mise en place du cytosquelette. Pourtant des études utilisant

différentes méthodes pour inhiber l'expression de la GFAP dans des souris ont révélé que les souris privées de GFAP se développaient à première vue normalement (McCall *et al.* 1996; Pekny *et al.* 1995; Gomi *et al.* 1995). Dans ces souris le SNC se développe normalement. Les cellules GFAP^{-/-} ne sont pas dénuées de FI puisque les autres filaments ne sont pas inhibés. En outre bien que la GFAP soit absente, l'activation gliale peut toujours être induite. On peut alors imaginer que la GFAP joue un rôle plus fin dans l'homéostasie de la cellule gliale. Des études ont montré en ce sens que la GFAP intervient dans des processus cellulaires fondamentaux comme la motilité, la prolifération, le trafic vésiculaire et l'autophagie mais également dans les interactions neurone-glie, l'homéostasie de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la protection ou neuro-protection en cas de lésion nerveuse et qu'enfin elle est capable de s'associer à de nombreuses protéines pour assurer ses fonctions (Middeldorp and Hol 2011) (Figure 18).

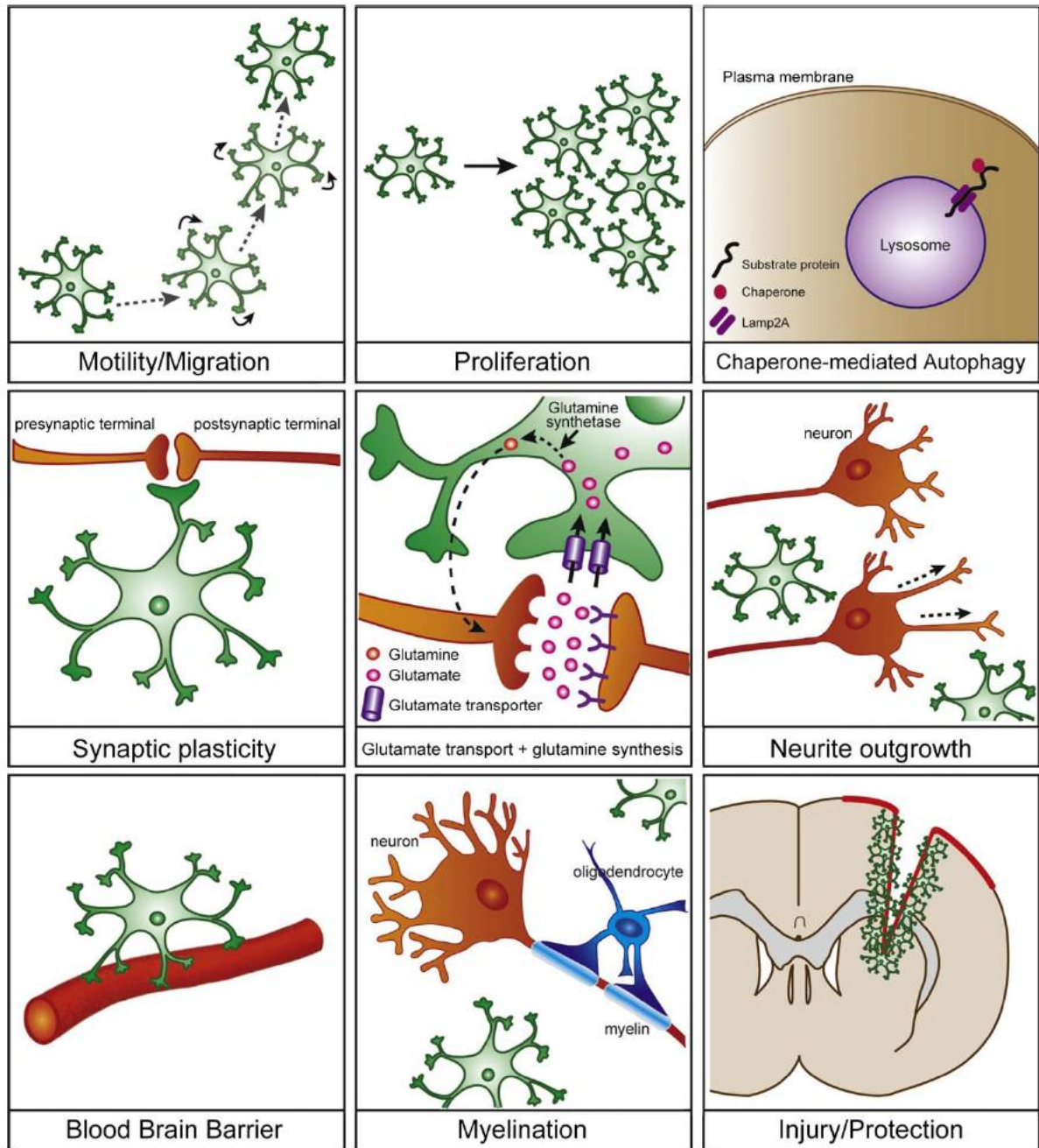


Figure 18: Représentation schématique des différentes fonctions dans lesquelles la GFAP est impliquée (Middeldorp and Hol 2011).

La GFAP intervient dans la motilité et la migration cellulaire. Des études ont montré qu'une surexpression de la GFAP induit une inhibition de la motilité cellulaire (Elobeid *et al.* 2000) et qu'à l'inverse une inhibition de la GFAP donnait lieu à des populations cellulaires capables de se mouvoir plus rapidement (Lepekhn *et al.* 2001). De la même manière des mutations sur le corps hélicoïdal de la GFAP induisent une augmentation de la motilité alors que des mutations sur la queue de la GFAP n'entraînent pas nécessairement de modification à ce niveau (Yoshida *et al.* 2007).

L'expression de la GFAP inhibe la prolifération cellulaire. Des études sur des cultures primaires d'astrocytes montrent une augmentation de la prolifération chez les cellules GFAP^{-/-} (Pekny *et al.* 1998a) et une baisse de la différenciation (Weinstein *et al.* 1991). A l'inverse, quand la GFAP est surexprimée la prolifération diminue et une augmentation de l'extension des prolongements cellulaires a été notée (Toda *et al.* 1994). De plus, lors de la prolifération, les cellules doivent passer les différentes phases du cycle cellulaire et notamment celle de la mitose. Il a été montré que la GFAP intervient dans cette phase en ajustant l'assemblage des filaments dans les cellules. Comme nous l'avons vu l'assemblage des filaments est conditionné par la phosphorylation-déphosphorylation du domaine « tête » de chaque GFAP. Lors de la division cellulaire on observe une augmentation des formes phosphorylées de la GFAP avec une translocation au niveau de la zone du sillon mitotique. Cette régulation de l'assemblage de la GFAP conduite par différentes kinases contribue au remodelage de la structure des cellules gliales lors de la mitose (Inagaki *et al.* 1994; Kawajiri *et al.* 2003).

La GFAP intervient dans le trafic vésiculaire et l'autophagie. Les cellules gliales peuvent libérer différents gliomédiateurs comme des peptides, des cytokines ou des facteurs neurotrophiques par différents mécanismes. Les microtubules et les filaments d'actine ne sont pas seuls à agir sur ce trafic. La dépolymérisation du réseau de FI affecte la mobilité des vésicules dans les astrocytes *in vitro* et cela concerne également la GFAP (Potokar *et al.* 2007). Il a été suggéré que des changements au niveau de l'architecture du cytosquelette de FI (en cas de gliose ou d'activation gliale où on retrouve justement une augmentation de l'expression de la GFAP) pourraient modifier le recyclage des vésicules et affecter le trafic des endosomes et des lysosomes. En conséquence cela pourrait altérer la dynamique de relargage de gliomédiateurs par les cellules gliales actives et au final pourrait contribuer à des processus neurodégénératifs (Potokar *et al.* 2010).

La GFAP intervient dans les interactions neurone-glie. De nombreuses études montrent qu'au niveau du SNC les astrocytes contribuent à de multiples fonctions des neurones comme la formation et la plasticité des synapses, le métabolisme énergétique, le transfert et le stockage de l'information synaptique (Perea and Araque 2007).

La GFAP intervient dans l'homéostasie de la BHE. La BHE est constituée par les cellules endothéliales avec leurs jonctions serrées et par les péricytes et les astrocytes périvasculaires. Il a été montré que des souris GFAP^{-/-} présentent des altérations de la BHE avec notamment une augmentation de sa perméabilité (Liedtke *et al.* 1996).

La GFAP intervient en cas de lésion. Différents types d'altération du SNC, comme une lésion mécanique ou une hypoxie, conduisent à une réaction gliale avec une surexpression de la GFAP et de la vimentine et à la formation d'une cicatrice gliale

(Eddelston and Mucke 1993). Le rôle de la GFAP dans l'établissement de cette cicatrice a souvent été étudié dans des modèles de souris GFAP^{-/-} et également pour la vimentine. Ces études montrent que la GFAP intervient dans la cicatrisation mais que cela se fait de concert avec la vimentine puisque les effets négatifs sont plus importants chez les souris GFAP^{-/-}/vimentine^{-/-} que chez les souris exclusivement GFAP^{-/-} ou vimentine^{-/-} (Pekny *et al.* 1998b; Nawashiro *et al.* 1998). Une étude suggère dans un autre modèle de souris GFAP^{-/-}, qu'en cas de lésions ischémiques la mort neuronale y est plus importante (Tanaka *et al.* 2002). Ainsi si on sait que les astrocytes comportent des effets protecteurs en partie conditionnés par la GFAP on ne peut que supposer ce même rôle pour la GFAP au niveau des CGE du SNE étant donné le manque d'étude à ce sujet.

La GFAP interagit avec de nombreuses protéines associées aux FI, que ce soit des protéines qui peuvent lier les FI aux organites cellulaires ou bien qui peuvent stabiliser les FI. Parmi ces protéines on retrouve par exemple la plectine qui peut lier les FI aux microtubules et aux filaments d'actine. La plectine intervient aussi dans la migration cellulaire et dans la résistance aux contraintes mécaniques en interagissant avec les éléments du cytosquelette. La GFAP δ peut aussi s'associer à la préséniline (Nielsen *et al.* 2002), une protéine transmembranaire dont les formes mutées causent des formes familiales de maladie d'Alzheimer (Cruts *et al.* 1996). Les protéines 14-3-3, qui interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la modulation de la structure des FI, peuvent aussi se lier à la GFAP. Cette liaison dépend de l'état de phosphorylation de la GFAP sur la sérine 8 (Li *et al.* 2006). Parmi les autres partenaires de la GFAP, il y a également les protéines de choc thermique α - β -crystalline et Hsp27 (*Heat shock protein 27*). La première intervient dans la régulation de l'assemblage des filaments de GFAP. La deuxième a été retrouvée avec la première dans des inclusions de GFAP dans certaines zones du cerveau de souris surexprimant la GFAP et de patients atteints de la maladie de Alexander (Eng *et al.* 1998; Perng *et al.* 1999). Enfin la GFAP interagit avec Lamp-2A (*Lysosomal associated membrane protein 2A*), une protéine de la membrane lysosomale, et EF1 α (*Elongation Factor 1 α*), une protéine intervenant dans l'élongation lors de la traduction protéique ainsi que dans le transport protéique et la régulation de l'autophagie (Bandyopadhyay *et al.* 2010).

4.3.6. La GFAP et l'activation gliale dans les pathologies

L'activation gliale ou gliose est classiquement caractérisée par une augmentation de l'expression de la GFAP, une hypertrophie et une prolifération des cellules gliales (astrocytes ou CGE). Il est communément considéré qu'un certain niveau d'activation gliale suite à une lésion dans le SNC est nécessaire et bénéfique pour le processus de récupération et/ou cicatrisation alors qu'une gliose excessive associée à une réponse neuroinflammatoire est

délétère pour la récupération fonctionnelle et structurale du cerveau (Sofroniew 2009). En général, l'activation gliale et donc l'augmentation de l'expression de la GFAP sont reconnues comme une conséquence d'un processus neurodégénératif et d'une mort neuronale. Elles se retrouvent donc dans des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, les démences fronto-temporales, la maladie de Creutzfeldt-Jakob et de Parkinson (Mamber *et al.* 2013). Bien sûr la sévérité, le développement et la localisation de cette activation gliale varie selon le type de maladie. La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire associée à la présence des corps et neurites de Lewy dans les neurones dopaminergiques survivants. Ces caractéristiques sont accompagnées par une activation des cellules microgliales dans le SNC (McGeer *et al.* 1988). Il a été montré que la densité des cellules GFAP positives augmente avec la sévérité de la perte neuronale dopaminergique dans différentes zones dopaminergiques du SNC dont la substance noire (Damier *et al.* 1993). Il a également été observé une augmentation de l'expression de la GFAP en lien avec la progression de la maladie en comparant les hypothalamus de patients parkinsoniens avec des témoins (Thannickal *et al.* 2007). Concernant le SNE dans la maladie de Parkinson, une étude plus récente par Devos *et al.* a montré une augmentation de l'expression des ARNm de la GFAP dans des biopsies de muqueuses coliques de patients parkinsoniens associée à un environnement inflammatoire caractérisé par une augmentation de l'expression des ARNm de cytokines proinflammatoires comme le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*), l'IL-6 (IL ; Interleukine), l'IL-1 β et l'INF- γ (Interféron- γ) (Devos *et al.* 2013).

4.4. CGE et fonctions motrices du TD

Contrairement aux neurones entériques qui sont des cellules dépolarisables, la caractérisation des fonctions des CGE a nécessité l'emploi de techniques basées sur des modèles de délétion chimiques ou génétiques *in vivo*, d'isolation et de culture cellulaire.

Le rôle de la glie entérique dans le contrôle de la motilité gastro-intestinale a été initialement abordé en utilisant des gliotoxines. Des souris traitées avec du 6-aminonicotinamide, un antimétabolite de la niacine (ou vitamine PP) connu pour être gliotoxique dans le SNC, ont une gliopathie entérique et développent des diarrhées (Aikawa and Suzuki 1985). Un traitement par une autre gliotoxine, le fluorocitrate, provoque une réduction de la vidange gastrique, un ralentissement du transit intestinal et du transit colique chez les souris (Nasser *et al.* 2006). En utilisant un modèle de délétion ciblée « tissu-spécifique », Aubé *et al.* ont aussi montré une altération significative de la motilité digestive chez les souris dont la glie entérique a été déplétée (Aube *et al.* 2006). Chez l'homme, il a

été suggéré que la glie entérique pouvait jouer un rôle dans la constipation sévère chronique, une pathologie gastro-intestinale marquée par une augmentation du temps de transit qui est réfractaire aux traitements classiques. Bassotti *et al.* ont étudié 26 patients avec une sévère constipation par ralentissement du transit qui nécessitaient une colectomie. Ils ont trouvé une réduction de la densité des CGE en comparaison à un groupe de sujets témoins (Bassotti *et al.* 2006).

4.5. CGE et neurotransmission dans le SNE

Tout comme les astrocytes du SNC, les CGE interagissent étroitement avec les neurones entériques et sont impliquées dans la neurotransmission et la neuroprotection entérique. Dans des modèles de culture primaire de SNE, les CGE augmentent la survie neuronale et diminuent la mort cellulaire induite par le stress oxydant (Abdo *et al.* 2012; Abdo *et al.* 2010). Des médiateurs gliaux produits par les CGE comme le glutathion réduit, la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine-J2 (15dPGJ2) et le GDNF (*Glial cell Derived Neurotrophic Factor*) sont impliqués dans ces effets (Abdo *et al.* 2010; Abdo *et al.* 2012; Anitha *et al.* 2006). Des changements dans le phénotype neuronal observés toujours dans un modèle d'altération gliale entérique suggèrent également que les CGE pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression de neuromédiateurs (Aube *et al.* 2006). En fait, dès les années 1970, Gabella avait noté la possibilité de l'existence de jonctions neurogliales dans le SNE en observant que les CGE sont richement innervées par des processus neuronaux (Gabella 1972). Toutes les CGE ou presque sont en effet contactées par ces processus vésiculés présentant une spécialisation de type présynaptique. Nous savons maintenant que les CGE sont capables de répondre à l'activité issue de ces transmissions neuronales par des augmentations des niveaux intracellulaires de Ca^{2+} et d'AMPC (Adénosine Mono-Phosphate cyclique) (Gulbransen and Sharkey 2012; Boesmans *et al.* 2013). En se basant sur ces résultats, McClain *et al.* ont montré que la propagation de l'activité gliale entérique signalée par ces modifications des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires se fait via les hémicanaux de connexine 43 (Cx43) (McClain *et al.* 2014). Pour faire ces observations ils ont utilisé un modèle murin de délétion spécifique de la Cx43 dans les CGE exprimant la GFAP. Ces souris ont un temps de transit colique plus long et une force isométrique de contraction du côlon diminuée par rapport aux souris sauvages. Ces travaux permettent de compléter les résultats d'une autre équipe qui a montré l'activation du réseau glial entérique par le complexe moteur migrant colique (Broadhead *et al.* 2012). Dans cette autre étude les auteurs ont mis en évidence des vagues calciques qui se propagent au niveau des zones de contact inter-CGE et ce depuis les prolongements gliaux vers les corps cellulaires. On sait

que dans le SNC, les hémicanaux de Cx43 de deux astrocytes différents s'associent pour former des jonctions communicantes (ou jonction gap) qui permettent ensuite la propagation de ces vagues calciques à travers le réseau glial central (Theis and Giaume 2012). Il est tentant d'imaginer que le même phénomène peut se produire dans le SNE avec les CGE. Ces vagues de calcium permettraient ainsi la synchronisation des CGE et surtout la synchronisation de leur réponse. Cependant ces études soulèvent la question de savoir à quels neurotransmetteurs les CGE sont capables de répondre. Des études ont révélé qu'elles expriment une batterie de récepteurs à différents neuromédiateurs comme les récepteurs purinergiques, glutamatergiques et adrénérgiques (Gulbransen and Sharkey 2012). Dans un modèle de culture de CGE humaines issues de biopsies de muqueuse duodénale, Boesmans et al. ont montré que les CGE peuvent être activées par l'ACh, la 5-HT et l'ATP (Boesmans *et al.* 2013). Parallèlement à ces découvertes il semble que les CGE pourraient également être une source de substrats pour les enzymes impliquées dans la synthèse de neuromédiateurs comme le laissent supposer les résultats d'une étude s'intéressant à la présence de L-arginine dans les CGE et son absence dans les neurones entériques (Nagahama *et al.* 2001). La L-arginine étant un précurseur utilisé par l'enzyme NOS pour la synthèse de NO.

4.6. CGE et Régulation de la BEI

Les données issues de modèles d'ablation ciblée et 'tissu spécifique' de la glie entérique ont permis de montrer que les CGE jouent un rôle dans la régulation de la BEI. L'ablation ciblée et totale des CGE provoque une inflammation fulminante du jéjunum et de l'iléon ainsi qu'une altération importante de la BEI (Bush *et al.* 1998; Cornet *et al.* 2001). Une ablation moins sévère et plus progressive des CGE induit quant à elle une augmentation de la perméabilité para-cellulaire en absence d'inflammation intestinale, ce qui reste malgré tout un effet délétère (Aube *et al.* 2006). Ces données *in vivo* ont été renforcées par des résultats obtenus en culture cellulaire. Dans un modèle de coculture de CGE avec une monocouche de CEI, les CGE augmentent la résistance trans-épithéliale et réduisent la perméabilité para-cellulaire en partie en modulant l'expression des protéines de jonctions serrées comme l'occludine et ZO-1 dans les CEI (Savidge *et al.* 2007). Les effets des CGE sur la résistance trans-épithéliale sont médiés en partie par le S-nitrosoglutathion (Savidge *et al.* 2007). Les CGE sont capables de renforcer la résistance de la BEI face à des agresseurs comme des bactéries (*Shigella flexneri* par exemple) ou des cytokines proinflammatoires (Flamant *et al.* 2011; Cheadle *et al.* 2013). Enfin, il est proposé que les CGE pourraient jouer le rôle d'intermédiaire entre neurones entériques, cellules interstitielles

de Cajal et les cellules musculaires lisses. Une étude a montré dans ce sens qu'une stimulation vagale protège la BEI d'une altération causée expérimentalement par une brûlure systémique (Costantini *et al.* 2010). Ces effets sont associés à une augmentation de l'expression de la GFAP dans les CGE, un signe d'activation gliale. De manière étonnante, une stimulation nicotinique *in vitro* (utilisée comme médiateur pour modéliser la communication SNE-nerf vague) induit un renforcement de la résistance de la BEI uniquement en présence de CGE (Costantini *et al.* 2012).

Toutefois, la distribution et les rôles du réseau glial entérique de la muqueuse épithéliale intestinale sont encore peu connus. En se penchant sur l'organisation des CGE dans la muqueuse, des études ont apporté quelques réponses notamment concernant la nature très extensive de leur distribution cellulaire. Liu *et al.* ont montré que les processus gliaux forment un réseau continu dans la *lamina propria* depuis la base des cryptes et s'étendant dans la muqueuse jusqu'à l'entrée des cryptes (Liu *et al.* 2013b) (Figure 19). Les CGE sont également en contact direct avec les vaisseaux sanguins mais aussi avec les vaisseaux lymphatiques présents dans la muqueuse. D'une manière générale les CGE semblent être positionnées dans la muqueuse de façon à servir d'intermédiaire dans la communication entre les CEI, les neurones entériques et les cellules immunitaires. Une étude plus récente a montré la proximité des CGE avec les cellules entéroendocrines et même plus précisément la proximité des CGE avec les neuropodes des cellules entéroendocrines (Figure 20) (Bohórquez *et al.* 2014). Les cellules entéroendocrines libèrent des amines et des peptides sur leur face basolatérale, lesquels agissent localement comme des régulateurs paracrines ou comme des hormones intestinales. Ces cellules comportent des *villi* qu'elles peuvent projeter dans la lumière intestinale. Elles seraient ainsi capables de « goûter » le contenu du lumen (Sternini *et al.* 2008). Le fait que ces neuropodes se forment plus fréquemment en présence de NGF (*Nerve Growth Factor*) suggèrent également que cette relation entre CGE et neuropodes est modulable (Bohórquez *et al.* 2014). Des facteurs relargués par les cellules entéroendocrines lors de la digestion pourraient agir sur le fonctionnement des CGE aux alentours, lesquels pourraient à leur tour réguler le fonctionnement de la BEI. Il a d'ailleurs été montré que les cellules entéroendocrines peuvent produire du GLP2, une molécule agissant de façon bénéfique sur la BEI, et que les CGE expriment le récepteur à ce peptide, le GLP2R. De cette manière les CGE peuvent être activées par ce ligand du GLP2R (de Heuvel *et al.* 2012).

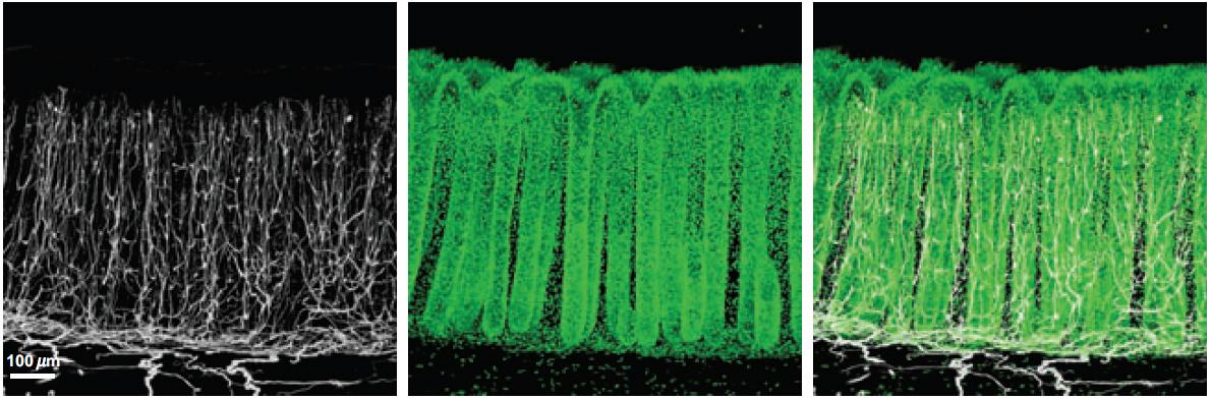


Figure 19: Vue transversale d'une muqueuse colique humain avec mise en évidence du réseau glial entérique par un marquage immunohistochimique de la protéine S100 β à gauche, un marquage nucléaire au SYTO 16 au milieu et un merge à droite (Liu et al. 2013b).

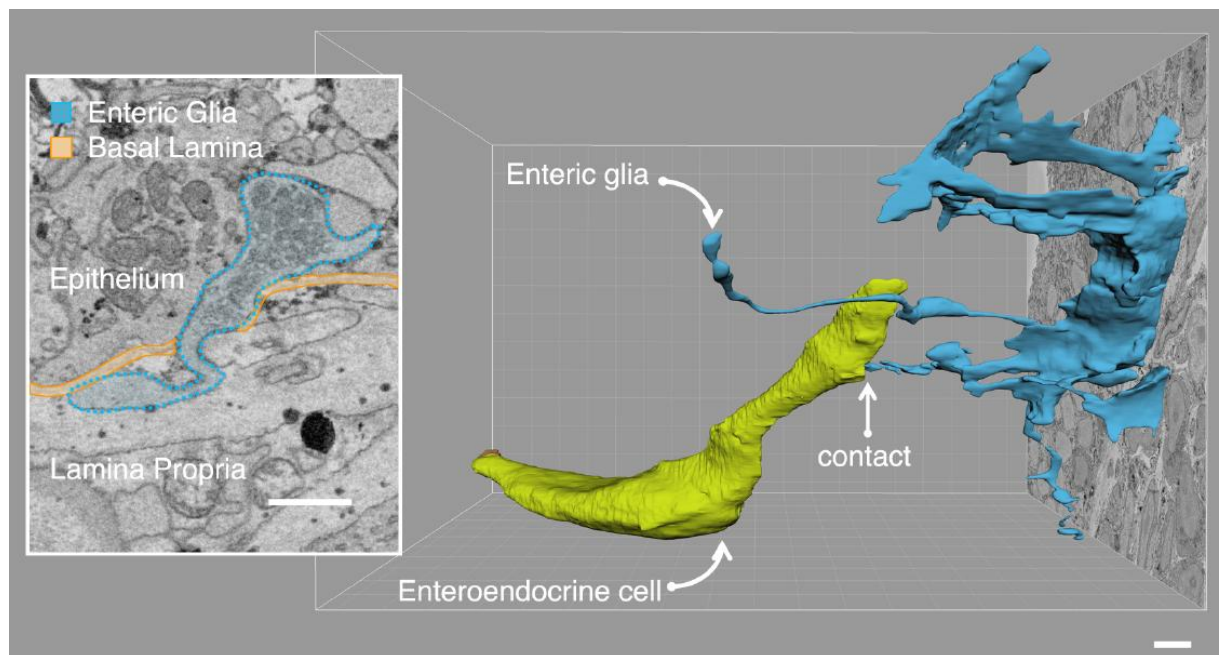


Figure 20: Les CGE viennent au contact des cellules entéroendocrines (barre d'échelle = 1 μ m) (Bohórquez et al. 2014).

Les CGE sont également impliquées dans les processus de réparation de la BEI. Il est désormais bien établi que les CGE produisent différents glio-médiateurs capables d'agir de façon bénéfique sur la BEI (Yu and Li 2014). Parmi ces médiateurs on retrouve le GDNF, le TGF- β 1, la 15dPGJ2, le GSNO (Glutathion-S-Nitrosylé) et le proEGF (précuseur de l'*Epidermal Growth Factor*). Le GDNF est impliqué dans la survie et la différenciation des neurones au niveau du SNC. Dans le SNE le GDNF a un effet anti-apoptotique sur les CEI. Ces effets sont médiés par une activation des voies de signalisation MAPK (*Mitogen-*

Activated Protein Kinase) et PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt) (Steinkamp *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2010). Le GDNF peut aussi inhiber l'expression de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α dans le côlon du rat (Zhang *et al.* 2010).

Des expériences *in vitro* et *in vivo* montrent que le proEGF est un médiateur qui permet l'amélioration de la réparation de la BEI après des altérations mécaniques et inflammatoires (Van Landeghem *et al.* 2011). Ces effets impliquent l'étalement des CEI via l'activation des voies de signalisation FAK (*Focal Adhesion Kinase*). De son côté le TGF- β 1 permet d'inhiber la prolifération des CEI (Neunlist *et al.* 2007). La 15dPGJ2 agit à travers l'activation du récepteur PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*), ce qui cause une inhibition de la prolifération des CEI et induit leur différenciation (Bach-Ngohou *et al.* 2010). Ces effets participent ainsi au renouvellement continu des CEI de l'épithélium intestinal.

4.7. La glie entérique dans les pathologies digestives

La communauté scientifique considère depuis quelques années que les CGE jouent un rôle central dans l'homéostasie du TD et également dans un certain nombre de pathologies digestives voir même extra-digestives, à travers leurs dysfonctions, introduisant alors le concept de « gliopathie entérique ». En effet des modifications des niveaux d'expression de la GFAP et de S100 β ont été observées dans différentes maladies associées à des altérations de la BEI. C'est notamment le cas des MICI. La GFAP et S100 β sont surexprimées dans le côlon des patients souffrant de rectocolite hémorragique (RCH) alors que leur expression n'est que peu ou pas modifiée dans la maladie de Crohn (von Boyen *et al.* 2011). Ces données suggèrent que le type de dérégulation gliale au niveau entérique est différent selon le processus pathologique en cause et que la RCH pourrait représenter un prototype de maladie de la glie entérique réactive. Que l'activation gliale entérique observée dans certaines MICI soit une cause ou une conséquence du processus inflammatoire reste une question non résolue. Il a également été suggéré que la glie entérique pouvait jouer un rôle dans la constipation sévère chronique (Bassotti *et al.* 2006). Ces observations ont conduit les auteurs à proposer que la constipation chronique pourrait être une neuro-gliopathie entérique qui pourrait être expliquée par une neurotransmission défectueuse induite par une perte de CGE (Bassotti *et al.* 2006). Des données récentes indiquent cependant que l'on retrouve des modifications de l'expression des marqueurs gliaux entériques dans des maladies extra-digestives où l'atteinte du SNE intrigue de plus en plus la communauté scientifique, c'est notamment le cas de la maladie de Parkinson (MP) (Devos *et al.* 2013)

5. La maladie de Parkinson

5.1. Aspects cliniques et neuropathologiques classiques de la MP

La maladie de Parkinson est une maladie du mouvement qui touche 1% de la population de plus de 65 ans (de Lau and Breteler 2006). La prévalence de la MP augmente avec l'âge. Ainsi au niveau mondial, pour 100 000 personnes, elle est de 41 pour les 40-49 ans, 107 pour les 50 à 59 ans et monte à 1087 pour les 70 à 79 ans avec un maximum à 1 903 pour les plus de 80 ans. Il existe aussi des différences géographiques puisque la prévalence dans la tranche d'âge 70-79 ans passe à 1 601 pour l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Australie contre 646 en Asie (Pringsheim *et al.* 2014). De plus la MP est à la deuxième place du classement des pathologies neurodégénératives en fréquence après la maladie d'Alzheimer (Nussbaum and Ellis 2003). Elle est classiquement caractérisée par une perte de neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc) accompagnée de la présence d'inclusions éosinophiliques cytoplasmiques dans les neurones survivants appelés corps et neurites de Lewy (respectivement CL et NL) et constitués principalement d'alpha-synucléine phosphorylée (Fujiwara *et al.* 2002). La destruction des neurones dopaminergiques conduit à un déficit en dopamine lequel est responsable des symptômes moteurs caractéristiques de la MP qui sont le tremblement de repos, l'hypertonie, l'akinésie et l'instabilité posturale. Les signes cliniques n'apparaissent qu'au-delà de 50% de perte neuronale dans la SNpc, le déficit dopaminergique striatal atteint alors les 80%.

5.2. Les pathologies de Lewy : corps et neurites de Lewy

Il y a un peu plus de 100 ans, Friederich H. Lewy décrivait des inclusions particulières dans le noyau dorsal du nerf vague et le noyau basal de Meynert chez les patients parkinsoniens (Lees *et al.* 2008). Dès 1919, Tretiakoff confirma leur présence dans la substance noire et employa le terme corps de Lewy en référence aux travaux du médecin du même nom (Lees *et al.* 2008). L'observation se fait ainsi dans un premier temps sur des coupes histologiques préparées *post mortem* et colorées à l'hématoxyline-éosine. Les CL apparaissent comme des petites masses éosinophiliques sphériques ou allongées voire filamenteuses avec un noyau dense et un halo en périphérie. Les formes allongées et filamenteuses sont essentiellement présentes dans les processus neuronaux et sont appelées les neurites de Lewy (NL) (Figure 21). Les pathologies de Lewy sont principalement neuronales mais il est intéressant de noter qu'on en retrouve également dans les astrocytes, les oligodendrocytes ainsi que les cellules microgliales (Wakabayashi *et al.*

2000). Ces inclusions gliales présentent d'ailleurs les mêmes particularités filamenteuses que les CL et NL neuronaux.

La composition de ces inclusions est longtemps restée une énigme. Beaucoup de protéines y ont été identifiées mais c'est en 1988 que l'une d'entre elle sort du lot de part son abondance : l'ubiquitine (Lowe *et al.* 1988; Kuzuhara *et al.* 1988). Avec l'avènement des techniques immuno-histochimiques, l'utilisation d'anticorps anti-ubiquitine a permis de simplifier et de préciser l'identification des inclusions pathologiques et donc le diagnostic *post mortem* pour quelques temps. Mais la vraie révolution arrive en 1997, quand Polymeropoulos *et al.* rapportent qu'une mutation du gène de l'alpha-synucléine, une protéine synaptique aux fonctions alors largement méconnues, est responsable de formes familiales rares de MP (Polymeropoulos *et al.* 1997). Suite à cette découverte plusieurs équipes de chercheurs ont très rapidement mis en évidence que l'alpha-synucléine constitue l'élément principal des CL et des NL (Spillantini *et al.* 1997; Spillantini *et al.* 1998; Wakabayashi *et al.* 1998). En 2002 une étude complète ces observations en précisant que l'alpha-synucléine retrouvée agrégée dans les pathologies de Lewy est phosphorylée (Figure 22) (Fujiwara *et al.* 2002). Dès lors, l'immunomarquage alpha-synucléine et phospho-alpha-synucléine est devenu la technique de référence pour l'identification des CL et des NL.

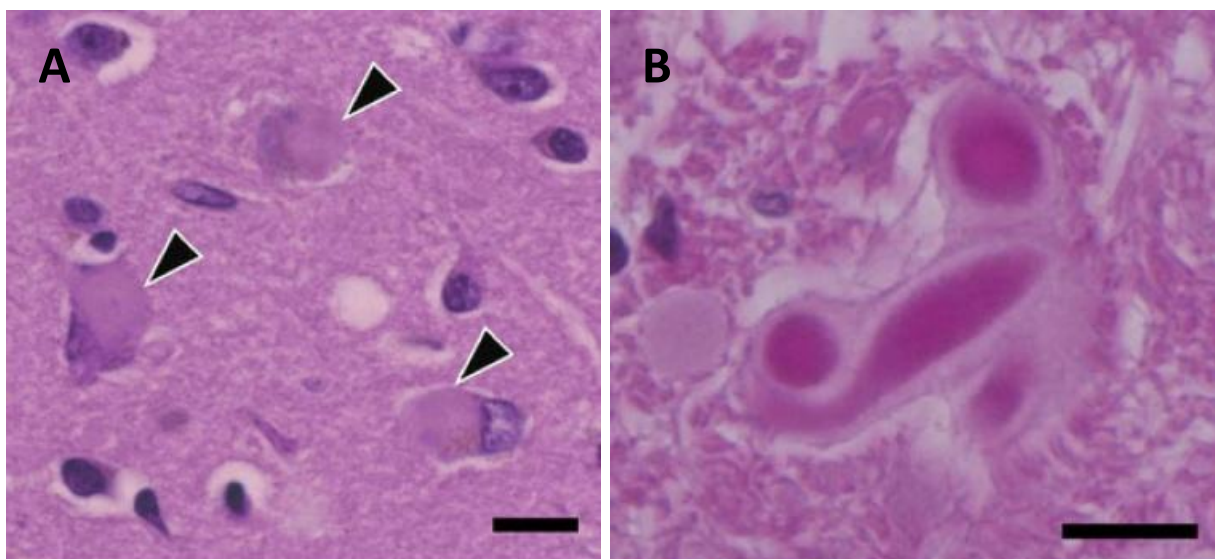


Figure 21: Corps et neurites de Lewy. A) Mise en évidence de CL (pointes de flèche). B) Mise en évidence de NL dans un axone. Coloration Hématoxyline-Eosine. Adapté de (Wakabayashi *et al.* 2012).

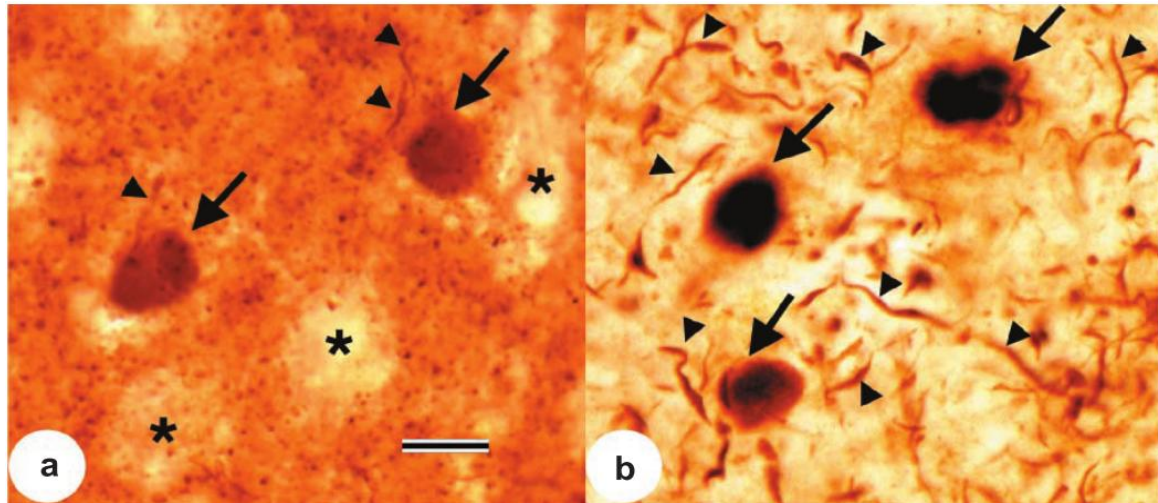


Figure 22 : a) CL et NL immunomarkés alpha-synucléine. b) même champs mais immunomarkage de l'alpha-synucléine phosphorylée. (Fujiwara et al. 2002).

5.3. La MP est aussi une maladie digestive

5.3.1. Troubles digestifs dans la MP

James Parkinson lui-même décrivait déjà dans son essai sur la paralysie agitante en 1817 un certain nombre de symptômes non moteurs (Parkinson 1817). Parmi ces symptômes il décrivait notamment des troubles gastro-intestinaux comme la dysphagie ou la constipation chez certains de ses patients. Ces observations l'avaient d'ailleurs déjà conduit dans ses commentaires à envisager une interaction entre le cerveau et l'intestin dans le déroulement de la maladie :

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

Traduction littérale : « Bien qu'incapable de déterminer le lien par lequel un état altéré de l'estomac et des intestins peut induire un effet morbide dans une zone de la moelle épinière, [...] il y a peu d'hésitation à avoir avant de déterminer la probabilité d'une telle occurrence. »

(Parkinson 1817)

Il est intéressant de constater que c'est seulement depuis quelques dizaines d'années, c'est-à-dire presque 2 siècles plus tard, que la communauté scientifique s'est de nouveau tournée vers ces symptômes. Il est désormais bien établi que la MP touche le TD

dans son ensemble (Fasano *et al.* 2015). En effet les patients parkinsoniens présentent des anomalies dès la cavité buccale. Sans parler des problèmes dentaires dont ils peuvent être gênés et qui sont principalement dus à une détérioration de leur dextérité et des difficultés à ouvrir les mâchoires lors du brossage des dents (Bakke *et al.* 2011), les parkinsoniens peuvent souffrir d'une diminution de la perception gustative et 60 % des patients présentent une hyposalivation (Cersosimo *et al.* 2011). La dysphagie œsophagienne est également fréquemment rapportée et augmente le risque de fausse route et donc d'infection pulmonaire ou d'étouffement (Kalf *et al.* 2012). La gastroparésie, ou ralentissement de la vidange gastrique, est un symptôme présent de manière précoce ou tardive selon les parkinsoniens mais sa prévalence varie de 70 à 100% des patients (Fasano *et al.* 2015). Enfin la constipation concerne quasiment tous les parkinsoniens et le fait qu'elle puisse apparaître des années avant les symptômes moteurs a suscité un vif intérêt. De ce point de vue, l'analyse des données de la cohorte du « *Honolulu Heart Program* » est remarquable. Ce suivi de cohorte sur le long terme lancé en 1965 incluait 8006 américano-japonais nés entre 1900 et 1919. Son objectif original était d'identifier des facteurs de risque pour les maladies cardiaques. En 1991 elle fut réorientée en « *Honolulu Asian Aging Study* » pour la recherche sur les maladies neurodégénératives dont la MP. Des caractéristiques environnementales, de qualité de vie et physiques ont donc été examinées pendant 40 ans (Ross *et al.* 2012). Les données montrent que les patients qui ont moins d'une selle par jour ont 2,7 fois plus de risques de développer une MP que ceux qui ont une selle par jour, et 4 fois plus de risques que les patients qui ont 2 selles ou plus par jour. Face à ces observations plusieurs hypothèses peuvent alors être émises. La constipation pourrait être une manifestation précoce du développement de la MP. La constipation pourrait aussi augmenter le temps d'exposition du TD et donc de l'organisme à une éventuelle substance toxique ingérée qui pourrait déclencher la pathologie (Pfeiffer 2003).

5.3.2. Atteinte neuropathologique dans le TD

Les premières descriptions des pathologies de Lewy dans le SNE remontent au début des années 1980. Différentes études les ont identifiées à la fois dans le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux d'abord dans le tiers inférieur œsophagien puis le côlon et ensuite dans l'estomac (Qualman *et al.* 1984; Kupsky *et al.* 1987; Wakabayashi *et al.* 1988). Plus récemment des travaux de plus grande envergure ont montré que la quasi-totalité des patients parkinsoniens présentent ces lésions au niveau du SNE et surtout sur l'ensemble du TD depuis le tiers inférieur œsophagien jusqu'au rectum (Beach *et al.* 2009). La répartition des lésions se fait cependant en suivant un gradient rostro-caudal de

l'œsophage vers le rectum. Ce gradient est d'ailleurs visible au sein même du côlon avec un plus grand nombre de pathologies de Lewy dans le côlon droit que dans le côlon gauche (Pouclet *et al.* 2012b).

La présence des CL et des NL dans le TD et la précocité des symptômes gastrointestinaux est suffisamment troublante pour que l'on se demande si la MP ne pourrait pas trouver son origine dans le TD. L'hypothèse d'une atteinte précoce du SNE a été suggérée par un anatomiste allemand, Heiko Braak. Les études autopsiques menées par ce chercheur ont en effet permis de mettre en évidence une progression temporo-spatiale ascendante des corps de Lewy dans le tronc cérébral ainsi que dans l'encéphale (Figure 23) (Braak *et al.* 2003). Ces observations suggèrent également que le noyau dorsal moteur du nerf vague serait la première structure touchée par les pathologies de Lewy dans le SNC, bien avant la SNpc. Ses travaux l'ont ainsi conduit à proposer l'hypothèse que le SNE serait le premier élément touché dans la MP. Un pathogène présent dans l'environnement passerait l'épithélium intestinal et déclencherait les premières agrégations d'alpha-synucléine au niveau des neurones entériques du plexus sous-muqueux avant que celles-ci se propagent au plexus myentérique puis au nerf vague pour gagner ensuite le SNC par le noyau dorsal moteur du vague (Figure 24) (Braak *et al.* 2006).

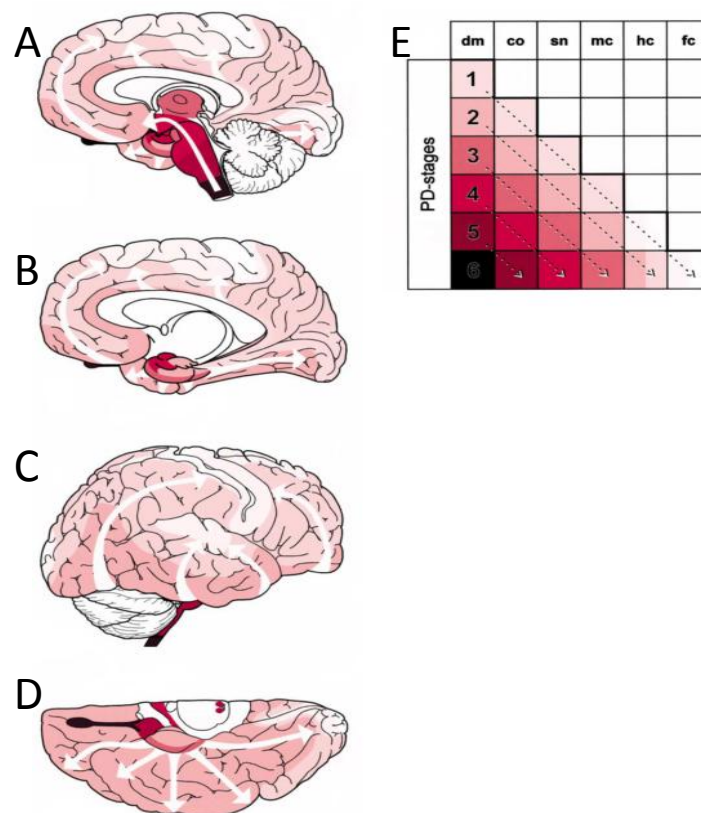


Figure 23 : Progression temporo-spatiale des inclusions d'alpha-synucléine dans l'encéphale. Les lésions surviennent initialement dans le noyau moteur dorsal du nerf vague (dm) (A,C) et

fréquemment dans le noyau olfactif antérieur (A,D). Les lésions du tronc cérébral montent ensuite vers des régions moins vulnérables : le locus coeruleus (co) au stade 2, la substantia nigra (sn) au stade 3 (A). Les lésions envahissent ensuite le cortex, commençant par le mésocortex temporal antéromédial (mc) au stade 4 (B). Le néocortex est touché à son tour, à débiter par les aires associatives polymodales et le cortex préfrontal (hc) (C,D). Enfin les aires associatives unimodales, sensorielles et motrices (fc) terminent l'évolution. D'après (Braak et al. 2003).

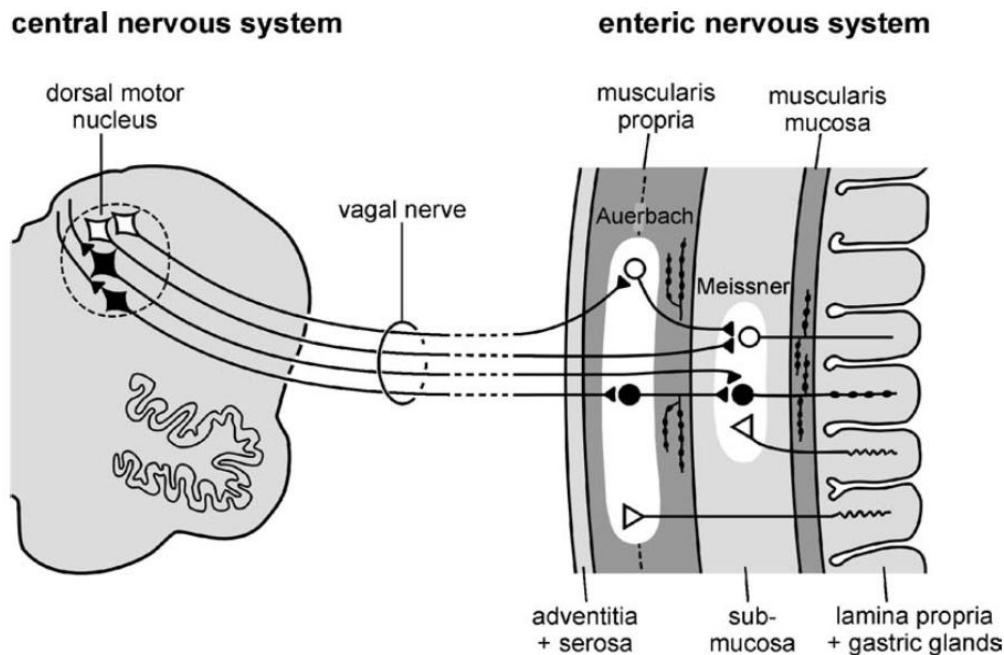


Figure 24 : Représentation schématique l'hypothèse de Braak. (Braak et al. 2006).

5.4. L'UNGE dans la MP

A ce jour aucun travail ne s'est intéressé à l'UNGE dans son ensemble dans la MP. Nous l'avons vu, de nombreuses études ont montré l'atteinte des neurones entériques avec la présence des NL dans le plexus myentérique comme dans le plexus sous-muqueux et plusieurs travaux plus récents ont montré que ces lésions pouvaient être étudiées du vivant du patient à travers l'utilisation de biopsies de muqueuse épithéliale intestinale. En revanche, les données disponibles sur les CGE et la BEI dans la MP ne sont encore que parcellaires. Une étude récente de notre laboratoire apporte quelques éléments concernant les CGE dans la MP. Nous avons montré que les patients parkinsoniens ont une augmentation de l'expression des transcrits des principales cytokines pro-inflammatoires le TNF- α , l'INF- γ , l'IL-6 et l'IL-1 β dans le tube digestif (Devos et al. 2013), comme cela a été montré dans le SNC (Hartmann et al. 2003). Ce profil pro-inflammatoire s'accompagne d'une augmentation de l'expression des transcrits des principaux marqueurs gliaux entériques, la GFAP et

Sox10, faisant évoquer l'existence d'une réaction gliale dans le TD au cours de la MP (Devos *et al.* 2013). Au regard des effets nombreux et importants des CGE sur l'homéostasie de la BEI que nous avons présentés un peu plus haut, il n'y a qu'un pas pour postuler que ce microenvironnement inflammatoire entérique pourrait contribuer à des modifications des fonctions de la BEI chez les patients parkinsoniens.

S'agissant de la BEI, seules 3 études se sont intéressées à son atteinte dans la MP (Davies *et al.* 1996; Forsyth *et al.* 2011; Salat-Foix *et al.* 2012). Chacune d'entre elles s'est attachée à évaluer la perméabilité de la BEI par l'utilisation de sucres non métabolisables ingérés par les patients et dosés ensuite dans les urines, une technique non invasive permettant de mesurer la perméabilité paracellulaire à différents niveaux du TD. Cependant ces études incluant de faibles nombres de patients, ont donné des résultats contradictoires. Deux études ont trouvé un profil d'absorption de ces sucres indiquant une hyperperméabilité de l'intestin grêle (Davies *et al.* 1996; Salat-Foix *et al.* 2012), quand la troisième montrait une augmentation de l'excrétion du sucralose sans changement du ratio lactulose/mannitol, un profil indiquant une augmentation de la perméabilité colique (Forsyth *et al.* 2011).

Hypothèses et objectifs

Notre hypothèse de travail est que l'atteinte digestive au cours de la MP ne se limite pas à la présence de pathologie de Lewy dans les neurones entériques mais que l'UNGE est touchée dans son ensemble. La première partie de ce travail de thèse a donc été consacrée à l'étude de la glie entérique dans la MP et plus particulièrement à l'étude de la présence éventuelle d'une réactivité gliale (Article 1). Dans la seconde partie, nous avons étudié la BEI dans la MP, non seulement d'un point de vue fonctionnel mais aussi morphologique (Article 2).

Article 1 : Expression et phosphorylation de la GFAP entérique dans la maladie de Parkinson.

Clairembault T., Kamphuis W., Leclair-Visonneau L., Rolli-Derkinderen M., Coron E., Neunlist M., Derkinderen P. (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/jnc.12742

Des changements de l'expression et/ou de la phosphorylation de la GFAP ont été rapportés dans des lésions de l'encéphale et dans des maladies neurodégénératives du SNC. Puisque les neurones entériques accumulent de l'alpha-synucléine dans la MP, nous nous sommes intéressés à étudier dans ce premier article si dans ce contexte la glie entérique des patients parkinsoniens est réactive en évaluant les niveaux d'expression et de phosphorylation de la GFAP dans des biopsies de muqueuse colique. Pour cela 24 parkinsoniens et 21 témoins sains correspondant en âge ont été inclus dans cette étude. Six patients atteints de paralysie supranucléaire progressive (PSP) et 6 patients atteints d'atrophie multi-système (AMS), deux syndromes parkinsoniens atypiques dont le SNE, en contraste avec la MP, n'est pas touché par le processus pathologique, ont également été inclus. Les niveaux d'expression et de phosphorylation de la GFAP ont été analysés dans les biopsies coliques par western blot. Des expériences complémentaires pour analyser plus précisément les isoformes de la GFAP exprimées par les CGE ont été menées en utilisant des RTqPCR. Nous avons montré que la GFAPk est l'isoforme principalement exprimée dans les CGE. Les patients parkinsoniens avaient, contrairement aux patients atteints de PSP et d'AMS, des niveaux d'expression de la GFAP plus élevés dans leurs biopsies coliques comparés aux témoins sains. La phosphorylation de la GFAP sur la sérine 13 était plus faible chez les parkinsoniens comparés aux témoins alors qu'aucun changement n'était observé chez les PSP et AMS. Cette étude apporte de nouvelles preuves de la présence d'une réaction gliale entérique chez les parkinsoniens et renforce le rôle du SNE dans l'initiation et/ou la progression de la maladie.

ORIGINAL
ARTICLEEnteric GFAP expression and phosphorylation in
Parkinson's disease

Thomas Clairembault,*†‡ Willem Kamphuis,§
Laurène Leclair-Visonneau,*†¶ Malvyne Rolli-Derkinderen,*†
Emmanuel Coron,*†‡¶ Michel Neunlist,*†‡ Elly M. Hol§**†† and
Pascal Derkinderen*†¶

*Inserm U913, Nantes, France

†University Nantes, Nantes, France

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

§Astrocyte Biology & Neurodegeneration, Netherlands Institute for Neuroscience, an institute of the
Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Amsterdam, the Netherlands

¶Inserm CIC-04, Nantes, France

**Swammerdam Institute for Life Sciences, Center for Neuroscience, University of Amsterdam,
the Netherlands

††Department of Translational Neuroscience, Brain Center Rudolf Magnus, University Medical Center
Utrecht, Utrecht, the Netherlands

Abstract

Enteric glial cells (EGCs) are in many respects similar to astrocytes of the central nervous system and express similar proteins including glial fibrillary acidic protein (GFAP). Changes in GFAP expression and/or phosphorylation have been reported during brain damage or central nervous system degeneration. As in Parkinson's disease (PD) the enteric neurons accumulate α -synuclein, and thus are showing PD-specific pathological features, we undertook the present survey to study whether the enteric glia in PD become reactive by assessing the expression and phosphorylation levels of GFAP in colonic biopsies. Twenty-four PD, six progressive supranuclear palsy (PSP), six multiple system atrophy (MSA) patients, and 21 age-matched healthy controls were included. The expression levels and the phosphorylation state of GFAP were analyzed in colonic biopsies by western blot. Additional

experiments were performed using real-time PCR for a more precise analysis of the GFAP isoforms expressed by EGCs. We showed that GFAP κ was the main isoform expressed in EGCs. As compared to control subjects, patients with PD, but not PSP and MSA, had significant higher GFAP expression levels in their colonic biopsies. The phosphorylation level of GFAP at serine 13 was significantly lower in PD patients compared to control subjects. By contrast, no change in GFAP phosphorylation was observed between PSP, MSA and controls. Our findings provide evidence that enteric glial reaction occurs in PD and further reinforce the role of the enteric nervous system in the initiation and/or the progression of the disease.

Keywords: enteric glial cells, enteric nervous system, glial fibrillary acidic protein, multiple system atrophy, Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy.

J. Neurochem. (2014) 10.1111/jnc.12742

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a major constituent of glial intermediary filaments that form the cytoskeleton of mature astrocytes. To date, nine splice variants of GFAP have been described in the human central nervous system (Kamphuis *et al.* 2014). GFAP α is the canonical isoform and most of the immunohistochemical studies on astroglia have used antibodies that do not discriminate between GFAP isoforms. The assembly of GFAP is controlled by its

Received January 8, 2014; revised manuscript received March 16, 2014; accepted April 11, 2014.

Address correspondence and reprint requests to Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. E-mails: derkinderenp@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Abbreviations used: EGCs, enteric glial cells; ENS, enteric nervous system; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MSA, multiple system atrophy; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PD, Parkinson's disease; PSP, progressive supranuclear palsy.

phosphorylation state, as its soluble phosphorylated pool is in dynamic equilibrium with the polymerized non-phosphorylated fraction of the protein (Inagaki *et al.* 1994). Several lines of evidence support a tight regulation of GFAP in neural development and also in the pathophysiology of several neurodegenerative disorders (Middeldorp and Hol 2011). GFAP gene mutations have indeed been associated with the fatal neurodegenerative condition Alexander disease (Yoshida and Nakagawa 2012). Furthermore, changes in GFAP expression and phosphorylation have been consistently reported in the central nervous system during neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and Parkinson's disease (PD) (Damier *et al.* 1993; Korolainen *et al.* 2005; Herskowitz *et al.* 2010; Kamphuis *et al.* 2014).

Astrocytes in the central nervous system are not the only cell type to express GFAP. In the early eighties, Jessen and Mirsky convincingly demonstrated that the glial cells in the enteric nervous system (ENS) were also immunoreactive for GFAP (Jessen and Mirsky 1980). This led to a reappraisal of the function and morphology of these glial cells, which were hitherto defined as Schwann cells. There is now a large body of evidence to support that the so-called enteric glial cells (EGCs) are in fact the digestive counterparts of central nervous system astrocytes (Gulbransen and Sharkey 2012). EGCs lie adjacent to the neurons in the enteric ganglia and envelop both the neuronal cell bodies and the axon bundles, an aspect that is highly reminiscent of the close relationship between astrocytes and neurons in the central nervous system (Jessen and Mirsky 1983). EGCs and astrocytes are also similar at the molecular and functional levels as they share electrophysiological and neuroprotective properties (Hanani 1993; Hanani *et al.* 2000; Abdo *et al.* 2010; Boesmans *et al.* 2013). In contrast to astrocytes, EGCs are readily accessible to biopsy and can therefore be analyzed in living patients (Lebouvier *et al.* 2010a; Neunlist *et al.* 2013). A routine colonic biopsy enables analysis of both mucosal and intraganglionic submucosal populations of EGCs and this approach has been used to demonstrate that GFAP is up-regulated in the gut of patients with inflammatory bowel disease (Boyen von *et al.* 2011).

It has become evident over the last 20 years that PD is not only a neurodegenerative brain condition but also a gut disorder (Cersosimo and Benarroch 2008; Derkinderen *et al.* 2011). Gastrointestinal symptoms are prominent non-motor manifestations of the disease (Edwards *et al.* 1993) and neuropathological studies showed the presence of Lewy pathology in the enteric neurons in the vast majority of patients (Beach *et al.* 2009). Our recent results showing an increase in total GFAP mRNA in the colon of PD patients suggest that enteric Lewy pathology in PD does not occur in isolation and may be accompanied by enteric glial reaction (Devos *et al.* 2013). In this study, we extended these preliminary results by determining whether this

increase in GFAP expression is specific for some isoforms and whether associated post-translational modifications are involved.

Patients and methods

Subjects

A total of 57 subjects participated in this study: 24 PD, six progressive supranuclear palsy (PSP), and six multiple system atrophy (MSA) patients as well as 21 healthy controls. PD patients aged 40–75 years were recruited from the movement disorder clinic at Nantes University Hospital, France. Diagnosis was made according to criteria provided by the United Kingdom Parkinson's Disease Survey Brain Bank (Hughes *et al.* 2002). PSP and MSA patients fulfilled the diagnostic criteria for possible or probable PSP (Litvan *et al.* 1996) and MSA (Gilman *et al.* 2008), respectively. Control subjects were healthy subjects who had a normal colonoscopy performed for colorectal cancer screening. All controls subjects underwent a detailed neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest VI*), conformed to the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062 and NCT01353183). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Endoscopic procedure and colonic biopsies

Four biopsies were taken in the sigmoid/descending colon during the course of a rectosigmoidoscopy for PD, PSP, and MSA patients and during a colonoscopy for control subjects. A follow-up call was scheduled 15 days after the endoscopic procedure. Biopsies were performed using standard biopsy forceps without needle (FB210K; Olympus co., Tokyo, Japan). Two biopsies were stored at -80°C in lysis buffer RA1 (Macherey-Nagel, Hoerd, France) for further analysis by real-time PCR and immunoblotting. The two remaining biopsies were snap frozen in liquid nitrogen at the time of collection and kept at -80°C .

Rat enteroglia cell line and treatment with serine/threonine phosphatases inhibitors

Enteric glial cell line was generated and cultured as previously described (Van Landeghem *et al.* 2011). At confluence, cells were treated with a cocktail of three phosphatase inhibitors for broad-spectrum inhibition of serine/threonine phosphatases including 1 μM okadaic acid, 5 μM cyclosporine A, and 6.75 μM sanguinarine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) for 3 h or with vehicle (100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, and 50 mM NaF).

Human brain sample

A coronal frozen section of a human brain devoid of neurodegenerative pathological changes passing through the head of caudate nucleus (approximately 10 mm thick) was kindly provided by Pr Charles Duyckaerts, CRICM, Salpêtrière, Paris, France. Samples of frontal cortex and subventricular zone (SVZ) were taken and lysed in NETF (100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, and 50 mM NaF) buffer (protein concentration: 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for undiluted cortex sample and 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for undiluted SVZ sample) for western

blot analyses (see below). Because GFAP δ is mainly observed in the adult SVZ, a lysate of this brain region at a 1 : 10 dilution was used for the evaluation of the expression of this specific isoform (Roelofs *et al.* 2005). Lysate of frontal cortex either diluted at 1 : 10 or 1 : 1000 was used for the evaluation of the expression of all others GFAP isoforms.

Western blot

Following RNA isolation, total proteins from the two-pooled biopsies were precipitated and prepared for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using protein precipitator and resuspension buffer [Protein solving buffer and TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphine) reducing agent, PSB/TCEP] from NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. For additional experiments on GFAP isoforms and phosphorylation, the two remaining biopsies that were dry frozen and stored at -80°C were lysed in NETF buffer containing 1% (v/v) IGEPAL ® CA-630, 2 mM orthovanadate, phosphatase inhibitor cocktail II (Roche, Neuilly sur Seine, France) and a protease inhibitors cocktail (Roche) using the 'Precellys 24' tissue homogenizer (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) and followed by sonication with 'vibracell 75 186' device (Sonics, Newton, CT, USA). Human brain samples and EGCs were processed in the same way. Total protein was quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Cillebon sur Yvette, France) for samples prepared with PSB/TCEP and bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce Thermo Scientific, Illkirch, France) for samples lysed in NETF buffer. Equal amounts of lysate were separated using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris MiniGels ™ together with the 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate (MES-SDS) running buffer before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes with the iBlot ™ Dry Blotting System also from Invitrogen (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). In some experiments, the MES-SDS buffer was replaced by the 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid/sodium dodecyl sulfate (MOPS-SDS) running buffer. Membranes were blocked for 1 h at 25°C in Tris-buffered saline (TBS) (150 mM NaCl, 15 mM Tris, 4.6 mM Tris Base, pH 7.4) with 5% non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. Details on the primary antibodies against GFAP are summarized in Table 1; mouse monoclonal anti- β -actin antibody was from Sigma and used at 1 : 10 000; rabbit anti-extracellular signal-regulated kinases was from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) and used at 1 : 1000. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies (Amersham, Les Ulis, France; diluted 1 : 5000) or anti-goat

antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Cliniscience, Nanterre, France; diluted 1 : 5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (ECLPrime, Amersham). When necessary, membranes were stripped for 15 min in Reblot buffer Strong ™ (Millipore, Molsheim, France) followed by extensive washing in TBS before reblocking for 30 min in TBS with 5% non-fat dry milk and reprobing. The relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J software. To allow comparison between different autoradiographic films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls. The value of GFAP was normalized to the amount of beta-actin or extracellular signal-regulated kinases (ERKs), for comparison between biopsies and between biopsies and brain samples, respectively, in the same sample and expressed as a percentage of the average of controls. Phospho-GFAP immunoreactivity was normalized to GFAP immunoreactivity.

Membrane dephosphorylation

The specificity of the pSer13 antibodies (Table 1) was tested using western blotting and dephosphorylation treatment. Protein homogenates were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membrane, and blocked for 1 h in TBS with 5% non-fat dry milk as performed above. The membrane to be dephosphorylated was placed in buffer (50 mM sodium acetate at pH 5.5 and 0.1% Tween 20) with 0.5 mg/mL acid phosphatase (Sigma) and incubated overnight at 37°C with gentle agitation. The control membrane was processed similarly but without acid phosphatase. Western blotting and stripping of membranes were performed as above.

Real-time PCR analysis

Total RNA (1.0 μg) was DNase I treated and used as a template to generate cDNA following the manufacturer's instructions (Quantitect Reverse Transcription Kit-Qiagen, Courtabouef, France) with a blend of oligo-dT and random hexamer primers. The reverse transcriptase reaction was incubated at 42°C for 30 min. The resulting cDNA was diluted 1 : 20 and served as a template in real-time qPCR assays (SYBR-Green PCR Master Mix; Applied Biosystems, Courtabouef, France). Primers were generated for the specific GFAP isoforms and tested for efficiency. The PCR signal was normalized against a set of reference genes to control for variability in the amount and quality of the RNA. Primer specificity and sensitivity are tested on dilution series of cloned GFAP isoforms to prevent unwanted cross-amplification of GFAP α , the most abundant transcript; details and primer sequences were described previously (Kamphuis *et al.* 2014).

Table 1 Human GFAP isoform-specific antibodies used in the present study

Name	Specificity	Epitope	Source and dilution
PanGFAP	α , δ , κ , $\Delta 135$, $\Delta\text{ex}6$, $\Delta 164$	Full-length GFAP cow	Dako, Les Ulis, France, rabbit polyclonal Z0334 (1 : 2000)
GFAPmono	α , δ , κ , $\Delta 135$	ITIPVQTFNSNLQIR	Sigma, mouse monoclonal GA5 (1 : 1000)
GFAP N-term	α , δ , κ , $\Delta 135$	MERRRRITSAARRSYVSSGEMMV	SCBT, mouse monoclonal F-2 (1 : 500)
GFAP C-term	α , $\Delta 135$	EMRDGEVIKESKQEHKQVM	SCBT, goat polyclonal C-19 (1 : 500)
GFAP δ	δ	QAHQIVNGTTPARG	Millipore, rabbit polyclonal (1 : 500)
GFAP κ	κ	SLGAFVTLQRS	NIN, rabbit polyclonal (1 : 500)
pSer13	@Ser13	aa sequence around @Ser13	SCBT, rabbit polyclonal (1 : 1000)

Statistics

All data are given as the mean \pm SEM. For comparisons of means between groups, a Mann–Whitney test was performed. Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

Results

Clinical features

Clinical features of the study population are shown in Table 2. Age and sex did not differ significantly between patients and control subjects. No complications occurred in the 57 patients included in this study, either during or after the endoscopic procedure.

Enteric GFAP expression is increased in PD but not in related disorders

In a first set of experiments, we evaluated the expression levels of GFAP in colonic biopsies by western blot with an antibody that recognizes the large majority of known isoforms and truncated forms of the protein (PanGFAP antibody, Table 1) (Middeldorp and Hol 2011; Kamphuis *et al.* 2012, 2014). The amounts of GFAP protein in colonic biopsies from PD patients were compared to samples from healthy subjects and patients with PSP and MSA, two atypical parkinsonian syndromes in which the ENS, in contrast with PD, is spared by the pathological process (Wakabayashi *et al.* 2010; Pouclet *et al.* 2012).

Detection of GFAP on western blots of protein samples from colonic biopsies with the PanGFAP antibody revealed one prominent and two weaker bands, migrating at 55, 50, and 45 kDa, respectively (Fig. 1a). When the density of all three GFAP-immunoreactive bands was assessed, a significant 1.2 fold increase in GFAP expression was observed in biopsies from PD patients as compared with controls (Fig. 1b). By contrast, the expression levels of GFAP in biopsies from PSP and MSA patients were significantly lower than in healthy controls (Fig. 1b). A separate analysis of each of the three GFAP-immunoreactive bands showed that the density of the 55-kDa band was significantly lower in patients with atypical parkinsonism compared with control subjects (Fig. 1c). A significant 1.6 fold increase in the density of the 50-kDa band was observed in PD patients when compared with controls (Fig. 1d), while the density of the 45-kDa band was not different between controls and patients (Fig. 1e).

GFAP κ is the main isoform expressed in enteric glia

To date, nine splice variants of GFAP have been described in the human central nervous system (Middeldorp and Hol 2011; Kamphuis *et al.* 2014). GFAP α , δ , and κ encode long isoforms of the protein of 432, 431, and 438 amino acids in length, respectively, that migrate together on PAGE at approximately 55 kDa (Fig. 2 and Table 3) (Middeldorp and Hol 2011; Kamphuis *et al.* 2014). GFAP Δ 135, Δ Ex6, and Δ 164 encode shorter isoforms of the protein of 387, 366, and 347 amino acids, respectively, with a faster migration profile on PAGE ranging between 40 and 45 kDa (Hol *et al.* 2003). All these isoforms are recognized by the PanGFAP antibody (Fig. 2) (Kamphuis *et al.* 2014). Regarding the three remaining known isoforms GFAP β , γ , and ζ , their detection at the protein level by PanGFAP or other anti-GFAP antibodies has never been tested (Zelenika *et al.* 1995; Condorelli *et al.* 1999). This suggests that the major 55-kDa migrating band we observed in Fig. 1 contains at least GFAP α , δ , and/or κ , whereas the two fastest migrating band at 50 and 45 kDa represent the alternatively spliced Δ 135, Δ Ex6, Δ 164 isoforms and/or truncated forms of GFAP that can be generated by N-terminal post-translational truncation (Lee *et al.* 2000; Zoltewicz *et al.* 2012).

To better identify the GFAP isoforms expressed by enteric glia, the immunoreactivity of five additional antibodies was analyzed in both colonic biopsies and human brain extracts using an adapted western blotting approach. Western blot experiments were performed using the MOPS-SDS running buffer as this buffer allowed a better separation of the GFAP isoforms when compared to the MES-SDS running buffer that was used in Fig. 1 (Fig. 3a). The first antibody we used (GFAPmono), which is specific for GFAP α , δ , κ , and Δ 135 (Table 1 and Fig. 2) (Middeldorp and Hol 2011; Kamphuis *et al.* 2014) detected one major band along with several faster migrating bands in human frontal cortex lysate (Fig. 3b and Figure S1). The pattern of immunoreactivity was different in colonic biopsies with one single major band migrating at 55 kDa in most samples (Fig. 3b). Faint faster migrating bands were visible in some biopsies lysates (see lane 1, Fig. 3b). The second antibody we used (GFAP C-term) is specific for the carboxy-terminal tail of GFAP α and the alternatively spliced variant GFAP Δ 135 (Table 1 and Fig. 2) (Middeldorp and Hol 2011; Kamphuis *et al.* 2014). This antibody detected one band at 55 kDa when the human frontal cortex lysate was diluted at 1 : 1000 (Fig. 3b) and

Table 2 Demographic data of control subjects and patients

	Controls (n = 21)	PD (n = 24)	PSP (n = 6)	MSA (n = 6)
Age, years	63.6 \pm 2 (39–75)	61.1 \pm 1.5 (44–71)	71 \pm 2 (63–75)	61 \pm 4.1 (51–71)
Gender, M/F	11/10	13/11	3/3	3/3

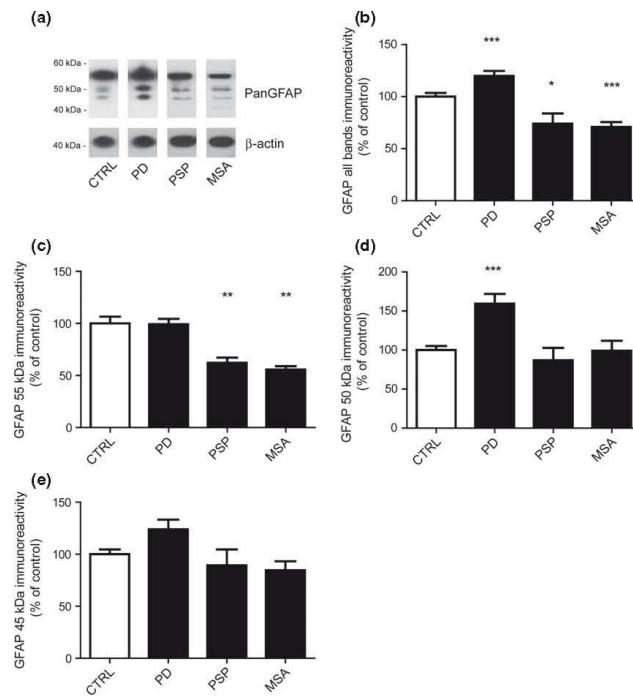


Fig. 1 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in colonic biopsies from patients with Parkinson's disease (PD), progressive supranuclear palsy (PSP), multiple system atrophy (MSA), and control subjects (CTRL). (a) Biopsies lysates (10 μ g of protein per sample) were subjected to immunoblot analysis using an antibody recognizing most known GFAP isoforms (GFAP, PanGFAP in Table 1) and beta-actin. The PanGFAP antibody detected three main bands in lysates of colonic biopsies, one major and two fainter bands, migrating at 55, 50, and 45 kDa, respectively. (b) Global quantification of all GFAP-immunoreactive bands. The optical densities of all three GFAP-immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of beta-actin immunoreactive bands in the same

samples, expressed as percentages of controls and added. Data correspond to mean \pm SEM of 21 samples for control subjects (CTRL), 24 samples for PD patients and six samples for PSP and MSA. Patients versus control, * p < 0.05 and *** p < 0.001. (c, d, e) Individual quantification of the three GFAP-immunoreactive bands at 55, 50, and 45 kDa. The optical densities of each GFAP-immunoreactive band were measured, normalized to the optical densities of beta-actin immunoreactive bands in the same samples, and expressed as percentages of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 21 samples for CTRL, 24 samples for PD patients and six samples for PSP and MSA. Patients versus control, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

two main bands migrating at 55 and 45 kDa when the 1 : 10 diluted lysate was used (Figure S1). In colonic biopsies, this antibody either detected a faint band at 55 kDa (Fig. 3b) or no specific band (Fig. 1). The third antibody (GFAP N-term), which recognizes intact GFAP α , δ , κ , and Δ 135 but not their amino-terminal cleavage products (Table 1 and Fig. 2) detected one band migrating at 55 kDa in human frontal cortex lysate diluted at 1 : 1000 (Fig. 3b) and two bands, one major and one minor migrating at 55 and 50 kDa, respectively, in the more concentrated brain lysate (Figure S1). A single major 55-kDa band was observed when this antibody was used in colonic biopsies (Fig. 3b and

Figure S1). An antibody specific for human GFAP δ (Table 1 and Fig. 2) that does not cross-react with other splice variants (Roelofs *et al.* 2005) failed to detect any specific band at the expected molecular weight in colonic biopsies (Fig. 3b), while it recognized a band migrating at the expected size in SVZ lysate (Fig. 3b). Finally, an antibody raised against a specific sequence of GFAP κ (Table 1) (Kamphuis *et al.* 2014) detected one major strong band migrating at 55 kDa in biopsies and a fainter band of approximately the same size in frontal cortex lysate (Fig. 3b). An additional faster migrating band was also observed in some samples (Fig. 3b). Taken together these

GFAP Alpha 432 aa, 49.9 kDa

1 merrritsaa rrsyvssgem mvvgglapgrr lgpqtrlsia rmpplptrv dfslagalna
 61 gfketraser aemmelndrf asyiekvrfl eqgnkalaee lnqlrakept kladvyqael
 121 reirrlrdql tansarleve rdnlagdlat vrqklqdetn lrleaennla ayrqadeat
 181 larldlerki esleeeirfl rkiheeevre lqeqlarqyv hveldvakpd ltaalkeirt
 241 qyeamassnm heaeewyrsk fadltdaaar naellrqakh eandyrqrllq sltcdleslr
 301 gtneslerqm regeerhvre aasygealar leeeegskld emarhlqeyq dllnvklald
 361 ieiatyrkil egeenritip vqtfnsllqir etsldtksvs eghlkrniyv ktvemrdgey
 421 ikeskqehkd vm

GFAP Delta 431 aa, 49.5 kDa

1 merrritsaa rrsyvssgem mvvgglapgrr lgpqtrlsia rmpplptrv dfslagalna
 61 gfketraser aemmelndrf asyiekvrfl eqgnkalaee lnqlrakept kladvyqael
 121 reirrlrdql tansarleve rdnlagdlat vrqklqdetn lrleaennla ayrqadeat
 181 larldlerki esleeeirfl rkiheeevre lqeqlarqyv hveldvakpd ltaalkeirt
 241 qyeamassnm heaeewyrsk fadltdaaar naellrqakh eandyrqrllq sltcdleslr
 301 gtneslerqm regeerhvre aasygealar leeeegskld emarhlqeyq dllnvklald
 361 ieiatyrkil egeenritip vqtfnsllqir ggkstkdgen hkvtrylksl tirvipigah
 421 qivngppar q

GFAP Kappa 438 aa, 50.3 kDa

1 merrritsaa rrsyvssgem mvvgglapgrr lgpqtrlsia rmpplptrv dfslagalna
 61 gfketraser aemmelndrf asyiekvrfl eqgnkalaee lnqlrakept kladvyqael
 121 reirrlrdql tansarleve rdnlagdlat vrqklqdetn lrleaennla ayrqadeat
 181 larldlerki esleeeirfl rkiheeevre lqeqlarqyv hveldvakpd ltaalkeirt
 241 qyeamassnm heaeewyrsk fadltdaaar naellrqakh eandyrqrllq sltcdleslr
 301 gtneslerqm regeerhvre aasygealar leeeegskld emarhlqeyq dllnvklald
 361 ieiatyrkil egeenritip vqtfnsllqir gqysrasweg hwsppasra crlltqtged
 421 qkqgiqlslg aFvtlgrg

GFAP Δ135 387 aa, 44.5 kDa

1 merrritsaa rrsyvssgem mvvgglapgrr lgpqtrlsia rmpplptrv dfslagalna
 61 gfketraser aemmelndrf asyiekvrfl eqgnkalaee lnqlrakept kladvyqael
 121 reirrlrdql tansarleve rdnlagdlat vrqklqdetn lrleaennla ayrqadeat
 181 larldlerki esleeeirfl rkiheeevre lqeqlarqyv hveldvakpd ltaalkeirt
 241 qyeamassnm heaeewyrsk fadltdaaar naellrqakh eandyrqrllq sltcdleslr
 301 gtnyqdlinv klaldieiat yrkllegeen ritipvtfs nlqiretsld tksvseghlk
 361 rniivvtvem rdgevikesk qehkdvem

Fig. 2 Epitopes recognized by the different anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) antibodies in the four main human GFAP isoforms. GFAPmono (single underline); GFAP C-term (double underline); GFAP δ (dashed underline); GFAP N-term (thick underline); GFAP κ (bold wavy underline). NCBI reference sequence: GFAP α: NP_002046.1; GFAP δ: NP_001124491.1; GFAP κ: NP_001229305.1. The expected molecular weights are indicated.

Table 3 Results of quantitative polymerase chain reaction assays

	C	C	C	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	Mean ± SEM
κ/α	0.28	2.40	0.78	1.28	1.32	0.18	0.13	4.94	3.83		1.68 ± 0.57
β/α	0.018		0.026	0.036		0.001		0.029			0.022 ± 0.006

Data are presented as ratio of GFAPκ and GFAPβ transcripts to GFAPα transcript.

results show that enteric glia does not express GFAPδ and Δ135, and that GFAPα is only a minor component of the main 55 kDa band detected by PanGFAP. Furthermore, the results obtained with GFAPκ and GFAP N-term antibodies strongly suggest that GFAPκ accounts for most of the GFAP immunoreactivity observed at 55 kDa and that the fastest migrating bands observed in PanGFAP immunoblots represent truncated products of this isoform.

To further refine the GFAP isoforms that are expressed by EGCs, PCR analyses were performed in biopsies from three control subjects and six PD patients. Transcripts for GFAPκ and α were the only ones to be consistently detected in all nine samples with the κ transcripts being 1.7-fold more abundant than the α transcript (Table 3). GFAPβ transcript was detected in five of the nine samples with an average β/α ratio of 2% (Table 3). All other isoforms transcripts, including GFAPδ and Δ135, were not or barely detectable. As a whole, our results obtained at the transcript and protein

levels are consistent and demonstrate that GFAPκ is the main isoform expressed in enteric glia.

Enteric GFAP phosphorylation at serine 13 is decreased in PD

GFAP can be phosphorylated at multiple sites in its amino-terminal domain, including threonine 7, serine 8, 13, 17, and 34 (Inagaki *et al.* 1994). Among these sites, serine 13 has recently received much attention as it has been shown to be regulated during central nervous system neurodegeneration (Herskowitz *et al.* 2010). We have therefore studied the regulation of GFAP phosphorylation at this residue in the ENS using a rabbit polyclonal phospho-specific antibody (pSer13, Table 1). As a first step, we have validated the specificity of this antibody in enteric glia by treating rat enteroglia cells with a combination of serine/threonine phosphatase inhibitors (okadaic acid, ciclosporin A, and sanguinarine) and by incubating nitrocellulose membranes

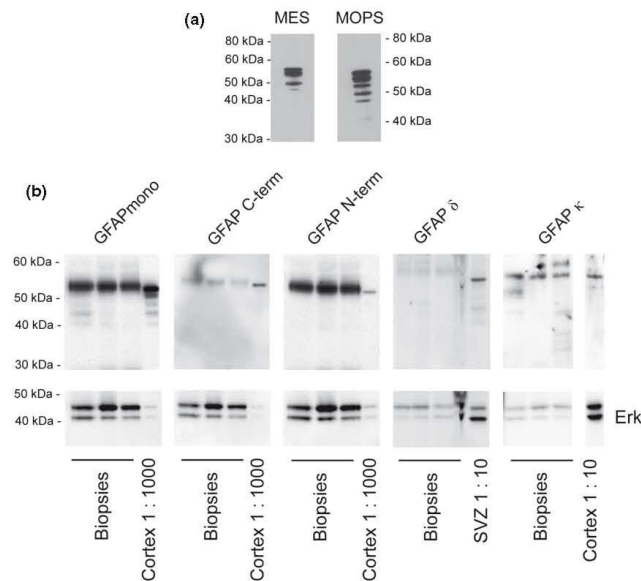


Fig. 3 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) isoforms expressed by enteric glia. (a) Comparison of immunoblot profiles between MES-SDS and MOPS-SDS running buffers. A colonic biopsy from a control subject was subjected to PanGFAP immunoblot analysis using either MES-SDS running buffer (MES) and MOPS-SDS running buffer (MOPS). (b) Colonic biopsies and brain samples lysates from healthy subjects were subjected to immunoblot analysis using the MOPS-SDS running buffers and various antibodies against specific isoforms of GFAP: GFAPmono specific for GFAP α , δ , κ , and $\Delta 135$; GFAP C-term specific for the carboxy-terminal tail of GFAP α and of the alternatively spliced

variant GFAP $\Delta 135$; GFAP N-term, which recognizes intact GFAP α , δ , κ , and $\Delta 135$ but not their amino-terminal cleavage products; isoform-specific anti-GFAP δ and anti-GFAP κ . The human frontal cortex lysate (Cortex) was diluted at 1 : 1000 for experiments with GFAPmono, GFAP C-term, and GFAP N-term, as these antibodies detect GFAP α , the most abundant GFAP isoform in brain. Human frontal cortex and subventricular zone (SVZ) lysates were both diluted at 1 : 10 for the evaluation of the GFAP κ and GFAP δ isoforms, respectively. Extracellular signal-regulated kinases (ERK) immunoblot was used as a loading control between biopsies and brain samples.

with acid phosphatase. pSer13 detected one major band migrating at 55 kDa in rat enteroglial cells only in the presence of phosphatase inhibitors (Fig. 4a). No immunoreactivity for pSer13 was observed if the membranes were dephosphorylated, while immunoblotting for PanGFAP revealed that regular GFAP was detected in both the normal and the dephosphorylated membrane (Fig. 4a). In colonic biopsies, pSer13 detected two bands, one major and one minor at 55 and 50 kDa, respectively, that comigrated with the two matching bands labeled by PanGFAP (Fig. 4b). Although highly variable between individuals, quantification of the X-ray films revealed that the expression levels of GFAP phosphorylated at serine 13 were significantly lower in PD patients as compared with control subjects (Fig. 4b, c and Figure S2). By contrast, no significant changes in pSer13 immunoreactivity were observed between PSP and MSA patients when compared with controls (Fig. 4b, c). Because the RA1 buffer that was used for storage and lysis of biopsies does not contain any phosphatase inhibitors, additional

experiments were performed to show that our results were not the mere consequence of sample dephosphorylation. To this end, snap-frozen biopsies were lysed at 4°C in the presence of the tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate and serine/threonine phosphatase inhibitors before being processed for western blotting. A decrease in pSer13 immunoreactivity was still observed in colonic biopsies from PD patients when this lysis method was used, confirming that our results were not because of artifactual dephosphorylation during sample preparation (Figure S3).

Discussion

Altogether, our previous results (Devos *et al.* 2013) and this study show that the expression of GFAP is increased at both mRNA and protein levels in mucosal and submucosal EGCs in PD. In analogy with the central nervous system, it has been proposed that GFAP up-regulation in the gut is induced by the activation of EGCs, a phenomenon known as reactive

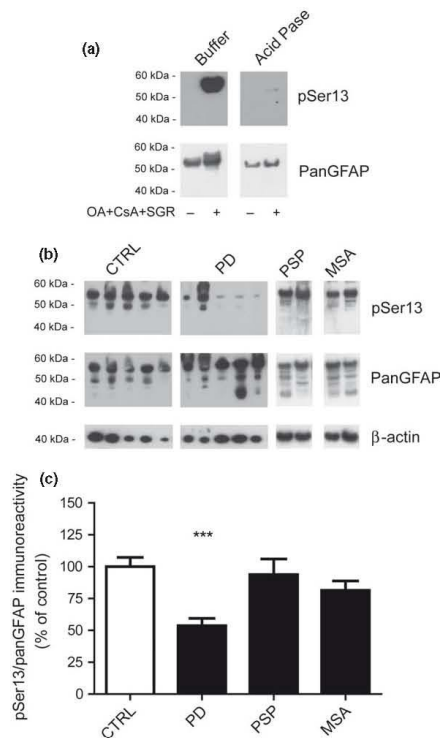


Fig. 4 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) phosphorylation at serine 13 in colonic biopsies from Parkinson's disease (PD), multiple system atrophy (MSA) and progressive supranuclear palsy (PSP) patients and in control subjects. (a) The specificity of the antibody against the phosphorylated form of GFAP phosphorylated at serine 13 (pSer13) was assessed in enteroglial cells treated or not with a cocktail of three phosphatase inhibitors including 1 μ M okadaic acid, 5 μ M cyclosporine A, and 6.75 μ M sanguinarine (OA+CsA+SGR) for 3 h or with vehicle. Fifteen μ g of cell lysates were subjected to immunoblot analysis, with the nitrocellulose membrane being treated with acid phosphatase (acidPhos) or not (buffer) before incubation with pSer13 antibodies. (b) Biopsies lysates (15 μ g of protein per sample) were subjected to immunoblot analysis using pSer13 antibody and reprobated with PanGFAP and beta-actin antibodies. The GFAP-Phospho-Ser13 antibody detects two bands at 55 and 50 kDa that comigrate with the two corresponding bands detected by PanGFAP antibody, either in biopsies from controls (CTRL), PD, PSP or MSA. (c) Quantification of the two immunoreactive bands at 55 and 50 kDa detected by the pSer13 antibody. The optical densities of the two pSer13-immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PanGFAP-immunoreactive bands in the same samples, expressed as percentages of controls and added. Data correspond to mean \pm SEM of 12 samples for CTRL, 19 samples for PD patients, 6 samples for MSA, and 5 samples for PSP patients (patients vs. control, *** p < 0.001).

gliosis. In the past few years, several studies have demonstrated that EGCs are critically involved in maintaining gut homeostasis (Neunlist *et al.* 2013) and especially in regulating gut inflammation (Cabarrocas *et al.* 2003; Ruhl 2005). Reactive gliosis as well as morphologically altered EGCs have been reported in the gut of patients with inflammatory bowel disease (Cornet *et al.* 2001; Boyen von *et al.* 2011) and studies in transgenic animals have showed that enteric glia ablation resulted in severe gut inflammation (Bush *et al.* 1998; Cornet *et al.* 2001; Aube *et al.* 2006). Further supporting the link between EGCs and inflammation, *in vitro* experiments obtained in cultured EGC showed that pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis alpha increase the expression levels of GFAP (Boyen von *et al.* 2004) and that once reactive, enteric glia is capable of secreting interleukin-6 (Ruhl *et al.* 2001). Regarding PD, we have recently shown that the expression levels of the main pro-inflammatory cytokines were increased in the colonic biopsies from PD patients and correlated with the expression of GFAP mRNA (Devos *et al.* 2013). By demonstrating the occurrence of glial reaction in the gut of PD patients, our results strongly support the assumption that PD is not restricted to the brain but is rather a systemic disorder that affects the peripheral autonomic networks and in particular the ENS (Braak and Del Tredici 2008; Beach *et al.* 2009). The data also reinforce the role of peripheral inflammation and associated glial reaction in the initiation and progression of the disease (Lema Tomé *et al.* 2013).

Various degrees of astrocytic reaction have been reported in the brain of parkinsonian syndromes, including PD, PSP, and MSA. In PD, reactive astrogliosis is usually mild, but abnormal synuclein deposition occurs in astrocytes, whereas MSA and PSP cases show marked astrocytic reaction, which is thought to contribute to neurodegeneration (Song *et al.* 2009). We show in the present report that, by contrast to PD, the levels of GFAP in colonic biopsies from PSP and MSA patients are either comparable or lower to the control subjects. This lack of increase in GFAP expression in the gut of MSA and PSP patients is a strong argument against the occurrence of enteric reactive gliosis and strongly suggests that the pathology in PSP and MSA is limited to the central nervous system. This is further supported by a small set of studies that showed the absence or paucity of pathologic lesions in the peripheral nervous systems in these two disorders (Wakabayashi *et al.* 2010; Pouclet *et al.* 2012).

Regarding the GFAP isoforms, our results were consistent between real-time PCR and western blot analyses and showed that GFAP κ , which is the most recently discovered GFAP isoform (Blechingberg *et al.* 2007), is by far the major isoform expressed by EGCs obtained from gastrointestinal biopsies. This stands in sharp contrast with the data that were recently obtained in human brain showing that the median expression level of GFAP κ transcript was 1.1% when the

level of GFAP α was set at 100% (Kamphuis *et al.* 2014). The GFAP κ protein has a C-terminal tail that is different from the C-terminal tails of the GFAP α and GFAP δ isoforms and it has been suggested that these differences may have a physiological consequence as GFAP κ , in contrast with GFAP α , has a low propensity to form homomeric intermediate filaments (Blechinger *et al.* 2007). Whether the high expression level of GFAP κ in the gastrointestinal tract has an impact on the physiology of EGCs still needs to be studied. Furthermore, it remains to be determined if the EGCs from the myenteric plexus, which are not accessible to routine gastrointestinal biopsies, also preferentially express GFAP κ like their mucosal and submucosal counterparts.

The phosphorylated residues located at the amino terminus of GFAP, including threonine 7, serine 8, 13, 17, and 34, are involved in the regulation of the protein self-assembly (Imagaki *et al.* 1994). Phosphorylation of GFAP at its amino-terminus residues causes disassembly of the intermediate filaments and conversely its dephosphorylation restores its potential to assemble (Takemura *et al.* 2002). As the integrity of the cytoskeleton is essential for normal astrocyte function, it has been suggested that GFAP phosphorylation may be an important regulatory mechanism in central nervous system disorders. In spite of this, there are very few studies that have examined the phosphorylation state of GFAP in pathological conditions. Using two-dimensional immunoblotting, Korolainen and collaborators convincingly showed that the total amount of phosphorylated GFAP was increased in Alzheimer's disease brains (Korolainen *et al.* 2005). Only two reports used a phospho-specific antibody to examine GFAP phosphorylation in brain neurodegeneration or insults. Using a phosphoproteomic analysis, Herskowitz *et al.* showed that the phosphorylation of GFAP at serine 13 was increased in the brain of individuals with frontotemporal lobar degeneration, a result that was validated by immunoblot with a phospho-specific antibody for GFAP phosphorylated at serine 13 (Herskowitz *et al.* 2010). Recently, Sullivan *et al.* (2012) demonstrated that the occurrence of hypoxia in pig brains was associated with increased amount of phosphorylation of GFAP at serine 13. Our findings showing GFAP hypophosphorylation at serine 13 in enteric glia during PD are thus apparently at odds with previous observations in brain damage. Nevertheless, given the role of GFAP phosphorylation in the plasticity of glia cytoskeleton, it could be argued that glial cells respond differently depending on the neurodegenerative process and that, by contrast to Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, reactive gliosis in PD is associated with a drop in GFAP phosphorylation. In this respect, it is worth noting that the phosphorylation state of GFAP has hitherto not been investigated in the brain of PD patients. As a logical follow-up of our study, it would be logical to study whether GFAP is also hypophosphorylated in brain astrocytes during PD.

There is increasing interest in bidirectional signaling between the gut microbiota and brain and the potential impact of this communication on the development of psychiatric and neurological disorders, leading to the concept of a microbiota–gut–brain axis (Forsythe *et al.* 2012). Although the precise mechanisms through which signals from gut bacteria are communicated to the brain are still largely unknown, evidence obtained from vagotomy experiments point toward a key role for the vagus nerve in the interplay between the microbiota and the brain (Forsythe *et al.* 2012). In this context, the enteric neurons, which are embedded in the wall of the gastrointestinal tract, show some unique features that make them prime candidates to act as a first relay between gut microbiota and the brain as: (i) some of them, located in the submucosal plexus send axons to the gut mucosa that are only micrometers away from the gut lumen and thus from the gut flora, (ii) their neurochemical phenotype and electrophysiological properties can be modulated by changes in the composition of gut microbiota (Kunze *et al.* 2009), and (iii) they synapse with both afferent and efferent vagal neurons (Walter *et al.* 2009). With regard to PD, Braak suggested that the involvement of the enteric neurons by Lewy pathology was an early event in the development of the disease. This led to the assumption, the so-called Braak's hypothesis, that PD pathology may in fact begin in the gastrointestinal tract further spreading to the central nervous system via the vagal pre-ganglionic innervation of the gut and thus following the brain–gut axis (Braak *et al.* 2006). Our results, showing significant changes in EGC during PD, further reinforce a possible role of the enteric nervous system in the initiation or the progression of the disease. Further work will be needed to determine whether changes in gut microbiota occur in PD and whether these changes are capable of modifying enteric neurons and EGC.

Despite technological advances in the field of molecular genetics and in *in vivo* imaging, no fully validated biomarker for PD is available yet (Marek *et al.* 2008) and there is still a need for new biomarkers that will complement the ones already available. The observations that demonstrated that Lewy pathology is not limited to the central nervous system but also involves peripheral tissues accessible to biopsies including skin, salivary glands, and gut, provide new opportunities to develop original histopathological markers of the disease that will directly assess the pathological process *in vivo* (Lebouvier *et al.* 2010c). Remarkably, by contrast to skin and salivary glands, a gut biopsy does not only contain post-ganglionic neuronal processes but a dense network of neurons and EGCs (Lebouvier *et al.* 2010a,b). By showing differences in the expression and phosphorylation of GFAP, our results support the use of a single colonic biopsy as an original source of biomarkers in PD beyond the sole assessment of Lewy pathology.

Acknowledgements and conflict of interest disclosure

This work was supported by a grant from the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (Rapid Response Innovation Award 2013) to PD and EH and by a grant of PSP France to PD. TC is supported by a grant from *centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens* (CECAP). Jacqueline Sluijs is acknowledged for her help with the real-time PCR. The authors declare no actual or potential conflict of interest.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Immunoblots of colonic biopsies and brain samples lysates diluted at 1 : 10 with GFAPmono, C-Term, and N-term antibodies.

Figure S2. Representative immunoblots of colonic biopsies lysates showing the heterogeneous phosphorylation of GFAP at serine 13 between PD patients.

Figure S3. GFAP phosphorylation at serine 13 in colonic biopsies lysed in NETF buffer.

References

- 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.
- Aube A. C., Cabarrocas J., Bauer J., Philippe D., Aubert P., Doulay F., Liblau R., Galmiche J. P. and Neunlist M. (2006) Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55**, 630–637.
- Beach T. G., Adler C. H., Sue L. I. *et al.* (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* **119**, 689–702.
- Blechinger J., Holm I. E., Nielsen K. B., Jensen T. H., Jørgensen A. L. and Nielsen A. L. (2007) Identification and characterization of GFAPkappa, a novel glial fibrillary acidic protein isoform. *Glia* **55**, 497–507.
- Boesmans W., Martens M. A., Weltens N., Hao M. M., Tack J., Cirillo C. and Vanden Berghe P. (2013) Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 183.
- Boyen von G. B., Steinkamp M., Reinshagen M., Schafer K. H., Adler G. and Kirsch J. (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* **53**, 222–228.
- Boyen von G. B., Schulte N., Pfluger C., Spaniol U., Hartmann C. and Steinkamp M. (2011) Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* **11**, 3.
- Braak H. and Del Tredici K. (2008) Invited article: nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1916–1925.
- Braak H., de Vos R. A., Bohl J. and Del Tredici K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72.
- 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.
- Cabarrocas J., Savidge T. C. and Liblau R. S. (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**, 81–93.
- Cersosimo M. G. and Benarroch E. E. (2008) Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov. Disord.* **23**, 1065–1075.
- Condorelli D. F., Nicoletti V. G., Barresi V., Conticello S. G., Caruso A., Tendi E. A. and Giuffrida Stella A. M. (1999) Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *J. Neurosci. Res.* **56**, 219–228.
- Cornet A., Savidge T. C., Cabarrocas J., Deng W. L., Colombel J. F., Lassmann H., Desreumaux P. and Liblau R. S. (2001) Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13306–13311.
- 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.
- Derkinderen P., Rouaud T., Leboviev 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.
- Devos D., Leboviev T., Lardeux B. *et al.* (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **50**, 42–48.
- Edwards L., Quigley E. M., Hofman R. and Pfeiffer R. F. (1993) Gastrointestinal symptoms in Parkinson disease: 18-month follow-up study. *Mov. Disord.* **8**, 83–86.
- Forsythe P., Kunze W. A. and Bienenstock J. (2012) On communication between gut microbes and the brain. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **28**, 557–562.
- Gilman S., Wenning G. K., Low P. A. *et al.* (2008) Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* **71**, 670–676.
- Gulbransen B. D. and Sharkey K. A. (2012) Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 625–632.
- Hanani M. (1993) Neurons and glial cells of the enteric nervous system: studies in tissue culture. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **4**, 157–179.
- Hanani M., Francke M., Härtig W., Grosche J., Reichenbach A. and Pannicke T. (2000) Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278**, G644–G651.
- Herskowitz J. H., Seyfried N. T., Duong D. M., Xia Q., Rees H. D., Gearing M., Peng J., Lah J. J. and Levey A. I. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals site-specific changes in GFAP and NDRG2 phosphorylation in frontotemporal lobar degeneration. *J. Proteome Res.* **9**, 6368–6379.
- Hol E. M., Roelofs R. F., Moraal E., Sonnemans M. A. F., Sluijs J. A., Proper E. A., de Graan P. N. E., Fischer D. F. and van Leeuwen F. W. (2003) Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol. Psychiatry* **8**, 786–796.
- Hughes A. J., Daniel S. E., Ben-Shlomo Y. and Lees A. J. (2002) The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* **125**, 861–870.
- Inagaki M., Nakamura Y., Takeda M., Nishimura T. and Inagaki N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* **4**, 239–243.
- Jessen K. R. and Mirsky R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* **286**, 736–737.
- 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.

- Kamphuis W., Mamber C., Moeton M. *et al.* (2012) GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS ONE* **7**, e42823.
- Kamphuis W., Middeldorp J., Kooijman L., Shuijs J. A., Kooi E.-J., Moeton M., Freriks M., Mizee M. R. and Hol E. M. (2014) Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 492–510.
- Korolainen M. A., Auriola S., Nyman T. A., Alafuzoff I. and Pirttilä T. (2005) Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol. Dis.* **20**, 858–870.
- Kunze W. A., Mao Y.-K., Wang B., Huizinga J. D., Ma X., Forsythe P. and Bienenstock J. (2009) *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *J. Cell Mol. Med.* **13**, 2261–2270.
- Lebouvier T., Coron E., Chaumette T., Paillisson S., Bruley des Varannes S., Neunlist M. and Derkinderen P. (2010a) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**, e11–4.
- Lebouvier T., Neunlist M., Bruley des Varannes S. *et al.* (2010b) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE* **5**, e12728.
- Lebouvier T., Tasselli M., Paillisson S., Pouclet H., Neunlist M. and Derkinderen P. (2010c) Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front. Psychiatry* **1**, 128.
- Lee Y. B., Du S., Rhim H., Lee E. B., Markelonis G. J. and Oh T. H. (2000) Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes in vitro induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I. *Brain Res.* **864**, 220–229.
- 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.
- Litvan I., Agid Y., Jankovic J. *et al.* (1996) Accuracy of clinical criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome). *Neurology* **46**, 922–930.
- Marek K., Jennings D., Tamagnan G. and Seibyl J. (2008) Biomarkers for Parkinson's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Ann. Neurol.* **64**(Suppl 2), S111–S121.
- Middeldorp J. and Hol E. M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* **93**, 421–443.
- Neunlist M., Van Landeghem L., Mahé M. M., Derkinderen P., Varannesdes 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.
- Pouclet H., Lebouvier T., Coron E. *et al.* (2012) Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18**, 893–895.
- Roelofs R. F., Fischer D. F., Houtman S. H., Shuijs J. A., Van Haren W., Van Leeuwen F. W. and Hol E. M. (2005) Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia* **52**, 289–300.
- Ruhl A. (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* **17**, 777–790.
- Ruhl A., Franzke S., Collins S. M. and Stremmel W. (2001) Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1163–G1171.
- Song Y. J. C., Halliday G. M., Holton J. L. *et al.* (2009) Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 1073–1083.
- Sullivan S. M., Sullivan R. K. P., Miller S. M., Ireland Z., Björkman S. T., Pow D. V. and Colditz P. B. (2012) Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem. Res.* **37**, 2364–2378.
- Takemura M., Gomi H., Colucci-Guyon E. and Itohara S. (2002) Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. *J. Neurosci.* **22**, 6972–6979.
- Van Landeghem L., Chevalier J., Mahe M. M., Wedel T., Urvil P., Derkinderen P., Saviège 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–G987.
- Wakabayashi K., Mori F., Tanji K., Orimo S. and Takahashi H. (2010) Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol.* **120**, 1–12.
- 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.
- Yoshida T. and Nakagawa M. (2012) Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocytes induced by GFAP mutation. *Neuropathology* **32**, 440–446.
- Zelenika D., Grima B., Brenner M. and Pessac B. (1995) A novel glial fibrillary acidic protein mRNA lacking exon 1. *Brain Res.* **30**, 251–258.
- Zoltewicz J. S., Scharf D., Yang B., Chawla A., Newsom K. J. and Fang L. (2012) Characterization of antibodies that detect human GFAP after traumatic brain injury. *Biomark. Insights* **7**, 71–79.

Article 2 : Altérations structurales de la barrière épithéliale intestinale dans la maladie de Parkinson

Clairembault T.*, Leclair-Visonneau L.*, Coron E., Bourreille A., Le Dilly S., Vavasseur F, Heymann M.-F., Neunlist M. and Derkinderen P. (2015) Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*. doi:10.1186/s40478-015-0196-0

*Co-auteurs

Des altérations fonctionnelles et morphologiques de la BEI ont été régulièrement décrites dans des maladies digestives comme les MICI ou le syndrome de l'intestin irritable. Les symptômes gastro-intestinaux sont fréquents et précoces dans la MP et ils pourraient être impliqués de façon critique dans le développement de la maladie. Nous avons donc mené cette deuxième étude pour analyser si des modifications fonctionnelles et/ou morphologiques de la BEI étaient présentes dans la MP. Pour cela des biopsies de muqueuse colique ont été prélevées lors de coloscopies sur 31 patients parkinsoniens et 11 témoins sains correspondant en âge. Les perméabilités paracellulaire et transcellulaire ont été évaluées en mesurant le flux d'acide sulfonique et de la peroxydase de raifort respectivement, sur les biopsies coliques montées en chambre de Ussing. L'expression et la localisation des protéines de jonction serrées ZO-1 et occludine ont été mesurées par western blot et immunohistochimie. Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas de modification significative des perméabilités paracellulaire et transcellulaire entre les parkinsoniens et les témoins sains. L'expression de l'occludine, mais pas de ZO-1, était significativement diminuée dans les biopsies coliques des parkinsoniens comparés aux témoins et la distribution cellulaire de ces deux protéines était altérée dans les muqueuses coliques des parkinsoniens. Nos données montrent que la BEI est morphologiquement altérée dans la MP et renforcent le rôle potentiel du TD dans l'initiation et/ou la progression de la maladie.

RESEARCH

Open Access

Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease

Thomas Clairembault^{1,2,3†}, Laureène Ledlair-Visonneau^{1,2,4†}, Emmanuel Coron^{1,2,3,4}, Arnaud Bourrelle^{1,3,4}, Séverine Le Dily⁴, Fabienne Vavasseur^{3,4}, Marie-Françoise Heymann^{2,5,6}, Michel Neunlist^{1,2,3} and Pascal Derkinderen^{1,2,4,7*}

Abstract

Functional and morphological alterations of the intestinal epithelial barrier (IEB) have been consistently reported in digestive disorders such as irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. There is mounting evidence that Parkinson's disease (PD) is not only a brain disease but also a digestive disorder. Gastrointestinal involvement is a frequent and early event in the course of PD, and it may be critically involved in the early development of the disease. We therefore undertook the present survey to investigate whether changes in the IEB function and/or morphology occur in PD. Colonic biopsies were performed in 31 PD patients and 11 age-matched healthy controls. The para- and transcellular permeability were evaluated by measuring sulfonic acid and horseradish peroxidase flux respectively, in colonic biopsies mounted in Ussing chambers. The expression and localization of the two tight junctions proteins ZO-1 and occludin were analyzed by Western blot and immunofluorescence, respectively. The para- and transcellular permeability were not different between PD patients and controls. The expression of occludin, but not ZO-1, was significantly lower in colonic samples from PD patients as compared to controls and the cellular distribution of both proteins was altered in colonic mucosal specimens from PD patients. Our findings provide evidence that the IEB is morphologically altered in PD and further reinforce the potential role of the gastrointestinal tract in the initiation and/or the progression of the disease.

Keywords: Parkinson's disease, Intestinal epithelial barrier, Enteric nervous system, Tight junctions, Occludin, ZO-1

Introduction

The intestinal epithelium forms a regulated barrier, known as intestinal epithelial barrier (IEB), between the blood circulation and the contents of the intestinal lumen [1]. It prevents the passage of noxious contents while allowing the absorption and secretion of nutrients [1]. Penetration of this barrier occurs via two routes, either between epithelial cells via the paracellular pathway, or through epithelial cell via the transcellular pathway [1]. Among the most important structures of the intestinal barrier are the epithelial tight junctions (TJs) that connect adjacent enterocytes together to determine paracellular permeability through the lateral intercellular space [2]. They are formed by transmembrane proteins such as claudins and occludins connected to the actin cytoskeleton via high

molecular weight proteins called zona occludens (ZO-1, ZO-2 and 3) [2]. Increased permeability of the IEB along with changes in the expression levels of TJs proteins have been consistently reported in several digestive disorders such as inflammatory bowel disease [3,4] and irritable bowel syndrome [5,6].

It has become evident over the last 20 years that PD is a gut disorder (reviewed in [7]). Gastrointestinal symptoms occur in almost every PD patient at some point and are among the most debilitating non-motor features of the disease [8]. These clinical data have been supported by *post mortem* studies that demonstrated the presence of Lewy bodies and neurites in the enteric neurons in nearly every case examined pathologically [9,10]. The German pathologist Heiko Braak suggested that the appearance of Lewy pathology in enteric neurons develop early in the course of disease, prior to the involvement of the central nervous system [11]. This led him to suggest that the gastrointestinal tract might be a portal of entry for a putative pathogen that would breach the IEB to induce the

* Correspondence: derkinderen@yahoo.fr

†Equal contributors

¹Inserm U913, 1 rue Gaston Veil, Nantes F-44035, France

²University Nantes, Nantes F-44093, France

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



formation of Lewy bodies and neurites in the enteric neurons [11].

The high prevalence of gastrointestinal symptoms and pathology in PD and the possible derangement of gastrointestinal permeability in the pathogenesis of the disease prompted several groups to investigate IEB permeability in parkinsonian patients. The three studies, which have been carried out to date have all used absorption of sugar probes as a means to investigate non-invasively the paracellular permeability [12]. These studies, which have included a small number of patients, led to conflicting results. Two studies found a pattern of sugar absorption reminiscent of small intestine hyperpermeability in a subset of patients [13,14] while the third one showed an increase in sucralose excretion without changes in the lactulose/mannitol ratio, a pattern consistent with increased colonic permeability [15]. We therefore undertook the present research to analyze in more details the IEB in PD. To this end, a functional and structural characterization of the IEB was performed in colonic biopsies from PD patients.

Materials and methods

Subjects

A total of 42 subjects participated in this study, 31 PD patients and 11 healthy controls. PD patients aged 43–74 years 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 [16]. Collected demographic data included gender, age at onset and disease duration, as well as age at colonoscopy. Complete drug history was obtained, and an approximation of the cumulative dose of L-dopa was made based on the equation developed by Parkkinen and collaborators [17]. Control subjects were healthy subjects who had a normal colonoscopy performed for colorectal cancer screening. All controls subjects underwent a detailed neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. Controls and PD patients were excluded if they suffered from irritable bowel syndrome and/or anorectal dysfunction. 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 (identifier NCT01748409). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer according to the principles of Helsinki.

Endoscopic procedure and colonic biopsies

For each subject, nine biopsies were taken in the sigmoid/descending colon during the course of a rectosigmoidoscopy for PD patients and during a colonoscopy for control subjects. Five biopsies were immersed in 4°C Hank's Balanced Salt Solution (Life Technologies, Saint Aubin, France): three of these biopsies were immediately processed

for the assessment of para- and transcellular permeability in Ussing chambers while the two other biopsies were used for immunohistochemistry experiments. Two biopsies were stored at -80°C in lysis buffer RA1 (Macherey-Nagel, Hoerd, France) with 1% (v/v) β -mercaptoethanol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) for further analysis by immunoblotting. The two remaining biopsies were snap frozen in liquid nitrogen at the time of collection and kept at -80°C .

Para- and transcellular permeability of colonic biopsies in Ussing chambers

Three biopsies were mounted in Ussing chambers (World Precision Instruments; WPI, Hertfordshire, UK) exposing a surface of 0.011 cm^2 . Tissues were bathed on each side with 3 ml of F12 supplemented Dulbecco's Modified Eagle medium (Invitrogen, France) containing 0.1% (v/v) fetal bovine serum, 200 mM Glutamine and 45 g/L of NaHCO_3 . The medium was continuously oxygenated and maintained at 37°C by a gas flow (95% O_2 /5% CO_2). After a 30 min baseline period, 275 μL of apical medium was replaced with 200 μL of media containing 1 mg/mL of fluorescein-5,6-sulfonic acid (molecular weight: 400 Da) (Life Technologies) for a final concentration of 0.1 mg/mL to assess paracellular permeability. Seventy-five microliters of media with 10 mg/mL of Horse Radish Peroxydase (HRP) (Sigma) were also added to the basolateral chamber for a final concentration of 0.375 mg/mL to measure transcellular permeability in a subset of PD patients and control subjects. The fluorescence level of basolateral aliquots of 150 μL , reflecting paracellular transit from the luminal surface was measured every 30 min over a 3-hour period using a fluorimeter (Varioskan[®], ThermoFisher Scientific, Cillebon sur Yvette, France). HRP quantities in the basolateral chamber, reflecting transcellular transit from the apical surface, was measured using an enzymatic activity assay with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine reagent (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France). Paracellular and transcellular permeabilities were determined by averaging the gradient of change in fluorescence intensity over time in the three biopsies that were analyzed per patient, using a linear regression fit model (GraphPad Prism 5, La Jolla, USA).

Western blot

For the analysis of ZO-1 expression, total proteins from the 2 biopsies stored in RA1 buffer were precipitated and prepared for Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) using protein precipitator and resuspension buffer (Protein solvating buffer and (tris(2-carboxyethyl) phosphine) TCEP reducing agent, PSB/TCEP) from NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. For experiments on the transmembrane protein occludin, the two

dry frozen biopsies stored at -80°C were lysed in UTC buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea and 4% CHAPS) containing a protease inhibitor cocktail (Complete™, Roche, Meylan, France) using the “Prcellys 24” tissue homogenizer (Bertin technologies, Saint Quentin-en-Yvelines, France) and followed by sonication with “vibracell 75 186” device (Sonics, Newton CT, USA). Equal amounts of lysate were separated using the Invitrogen NuPage Novex 3-8% Tris-Acetate Midi Protein Gels™ for ZO-1 or NuPage Novex 4-12% Bis-Tris MidiGels™ for occludin before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes with the iBlot™ Dry Blotting System also from Invitrogen. Membranes were processed for immunoblotting using rabbit polyclonal anti-ZO-1 (1:500, Life Technologies) and rabbit anti-occludin (1:250, Abcam, Paris, France) antibodies and the relevant immunoreactive bands were quantified as previously described [18].

Microdissection and immunohistochemistry

Microdissection was performed as previously described [19] in two out of the nine biopsies taken per patient. Each whole-mount preparation of submucosa obtained from a single biopsy was permeabilized for 3 hours in phosphate buffered saline (PBS)/ NaN_3 containing 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) horse serum and then incubated with antibodies against phosphorylated alpha-synuclein (1:5000, WAKO, Osaka, Japan) and PGP9.5 (1:10,000; Ultraclone Limited, UK). Each whole-mount preparation of mucosa was treated for 24 h with Scale A2 solution composed of 4 M urea, 10% (w/v) glycerol and 0.1% (v/v) Triton X100 [20] then incubated with rabbit polyclonal antibodies to ZO-1 (1:100, Life Technologies) and occludin (1:100, Abcam). Suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 and 594 were used (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Following incubation with the secondary antibodies, the mucosa samples were treated for 10 minutes with a solution of 0.3% (w/v) of Sudan Black B powder (Sigma) dissolved in 70% (v/v) ethanol, then washed extensively with PBS. Whole specimen of submucosa and mucosa were viewed under an Axio Zoom.V16 stereomicroscope (Zeiss, Marly Le Roi, France). All samples were deidentified and studied in a blinded manner. For the analysis of ZO-1 and occludin immunofluorescence, the percentage of morphologically normal crypts per biopsy was calculated and the following classification was used: ‘normal’, more than 2/3 of morphologically normal crypts; ‘mild disruption’: between 1/3 and 2/3 of morphologically normal crypts; ‘disrupted’: less than 1/3 of morphologically normal crypts.

Statistics

All data are given as the mean \pm standard error of the mean (SEM). For comparisons of means between groups, a Mann–Whitney test was performed. Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$.

Results

A total of 31 PD patients and 11 controls were included. Table 1 shows the main clinical and demographic features of all patients. Age and sex did not differ significantly between PD patients and control subjects (mean age was 64.2 ± 2.1 for PD and 60.6 ± 1.4 for controls, $p = 0.25$; 22/31 male in PD group and 6/11 male in control group, $p = 0.13$).

Para- and transcellular permeability are unaffected in PD

In a first set of experiments, we evaluated whether IEB is functionally altered in PD patients. The para- and

Table 1 Main clinical characteristics of PD patients

	Age	Sex	Disease duration (years)	Cumulative lifetime dose of L-dopa (mg)
1	70	F	2	0
2	64	M	NK	NK
3	70	M	NK	NK
4	66	M	23	66111000
5	47	F	2	0
6	62	M	4	3823375
7	74	M	13	1505625
8	53	M	4	2372500
9	69	M	2.5	273750
10	43	F	11	508050
11	67	M	2.3	0
12	58	M	7	2135250
13	58	M	9	1533000
14	72	F	14	1442662.5
15	64	M	4	492750
16	64	M	10	355875
17	56	M	NK	NK
18	66	M	4.6	0
19	62	M	26	1560375
20	70	F	2.2	219000
21	57	M	1.8	0
22	58	M	13	2007500
23	50	M	8	1286625
24	69	F	28	3759500
25	62	M	8	511000
26	56	F	8	1241000
27	46	M	10	1213625
28	56	F	8.4	866875
29	58	F	4.8	447125
30	54	M	24	3085423
31	58	M	10	3374130

NK: not known.

transcellular permeability of colonic biopsies were measured in Ussing chambers in both PD patients and control subjects using sulfonic acid and HRP, respectively. No difference in the sulfonic acid flux was observed between PD patients and control subjects ($n = 31$ and 11 , respectively; $p = 0.65$) (Figure 1A). HRP flux was also comparable between PD subjects and healthy controls ($n = 21$ and 9 , respectively; $p = 0.39$) (Figure 1B). Although not statistically different from controls, the sulfonic acid and HRP flux values were heterogeneous between PD patients (Figure 1A and B). We thus investigated if the main clinical features of the disease had any influence on IEB

permeability. We did not observe any correlation between age, disease duration or lifetime cumulative dose of L-DOPA and the values of sulfonic acid or HRP flux (Table 2).

There is a growing body of evidence supporting a key role for submucosal enteric neurons in the regulation of IEB functions [21-23]. This prompted us to study if the flux values of sulfonic acid and HRP were related to the presence of Lewy bodies and Lewy neurites in the submucosa. To this end, two biopsies per patient were immunohistochemically assessed for the presence of Lewy pathology using antibodies against phosphorylated alpha-synuclein and PGP9.5 (Figure 2A and B). A biopsy was deemed positive when containing at least one inclusion immunoreactive for both phosphorylated alpha-synuclein and PGP9.5 (Figure 2C). A patient was noted as positive when at least one of the two biopsies displayed inclusion(s). In accordance with our previous reports [24,25], the intraneuronal inclusions found in the submucosal plexus were chiefly observed in the neuronal processes and thus reminiscent of Lewy neurites (Figure 2A-C). Twenty-three out of 31 PD patients were positive for phosphorylated alpha-synuclein inclusions. All control subjects were devoid of inclusions. The values of sulfonic acid and HRP flux were not different between PD patients with or without inclusions (Figure 2D and E).

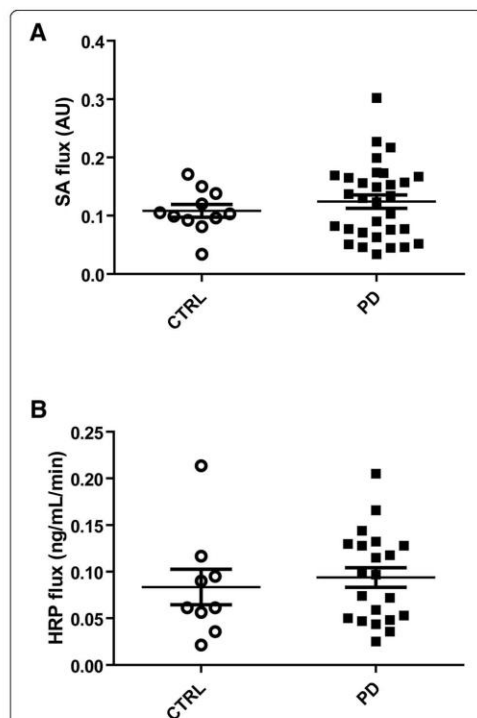


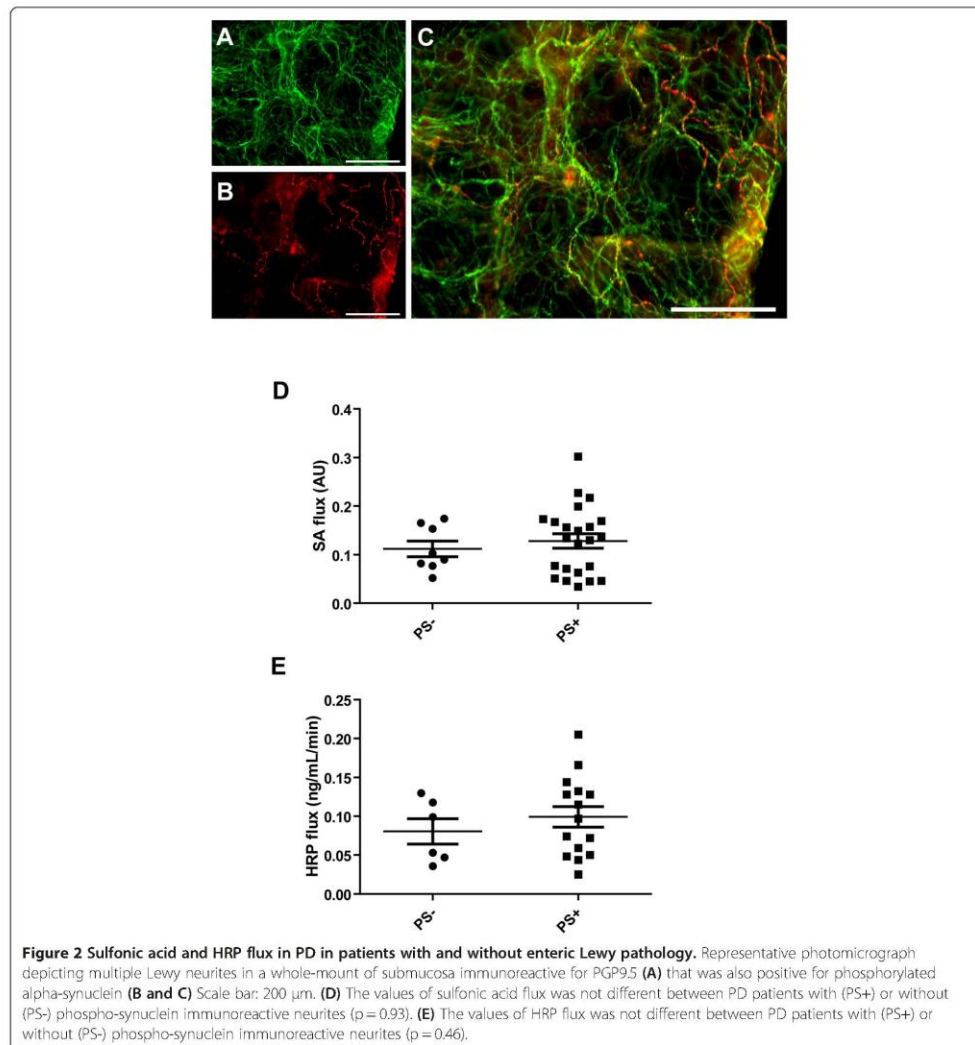
Figure 1 Comparison of para- and transcellular permeability in PD patients and healthy controls. (A) For the evaluation of paracellular permeability, the flux of sulfonic acid (SA flux) was measured in colonic biopsies mounted in Ussing chambers, expressed in arbitrary units (AU), in PD patients ($n = 31$) and controls (CTRL, $n = 11$). No significant changes were observed between the two groups ($p = 0.65$). **(B)** For the evaluation of paracellular permeability, the flux of horseradish peroxidase (HRP flux) was measured in colonic biopsies mounted in Ussing chambers, expressed in ng/mL/min, in PD patients ($n = 21$) and controls (CTRL, $n = 9$). No significant changes were observed between the two groups ($p = 0.39$).

Expression of the tight junction protein occludin is decreased in PD

We next investigated whether structural changes in the IEB occur in PD. The expression levels of the TJs proteins ZO-1 and occludin were analyzed by Western blot in colonic biopsies from PD subjects and healthy controls. A significant decrease in the expression of occludin was observed in colonic samples of PD patients as compared to controls (Figure 3A and B). A doublet band of approximately 220 kDa was observed on Western blot with antibodies against ZO-1 (Figure 3A). As previously shown, these two bands most likely represent the two ZO-1 isoforms [26,27]. By contrast to occludin, no change in ZO-1 expression levels was observed in PD whether the two bands were quantified together (Figure 3C) or separately (data not shown).

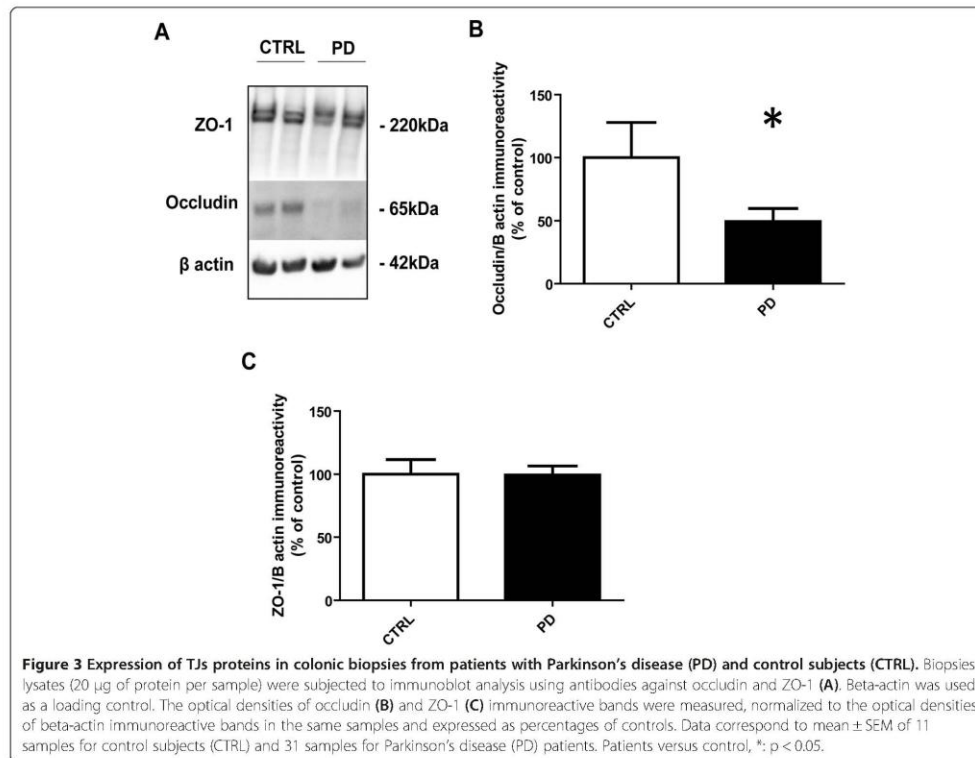
Table 2 Spearman's correlation with sulfonic acid (SA) and HRP permeability in PD patients

	Age	Disease duration	Cumulative lifetime dose of L-dopa
SA	$p = 0.090$ $r = 0.303$	$p = 0.788$ $r = 0.052$	$p = 0.830$ $r = -0.046$
HRP	$p = 0.165$ $r = 0.323$	$p = 0.469$ $r = 0.172$	$p = 0.754$ $r = 0.082$



Cellular distribution of the TJs proteins is altered in PD
 The cellular distribution of occludin and ZO-1 was further investigated by immunofluorescence in 8 controls and 31 PD subjects. Samples from 3 controls were excluded because the mucosa was too small and/or too damaged to allow a reliable analysis of the TJs morphology. A mean of 96.4 crypts per biopsy were analyzed. We observed differences in the cellular distribution of both ZO-1 and occludin between PD patients and

controls (Figure 4). A normal and typical reticular pattern of occludin and ZO-1 staining was observed in the colonic samples of 6 out of 8 controls (Figure 4A and C, Additional file 1) and in only 9/31 PD patients (Figure 4B and D, Additional file 1). TJs morphology was disrupted and irregularly distributed in the mucosa of 1 out of 8 controls (Figure 4A and C, Additional file 1) and in 14/31 PD patients (Figure 4B and D, Additional file 1). An occasional and mild disruption of TJs morphology was

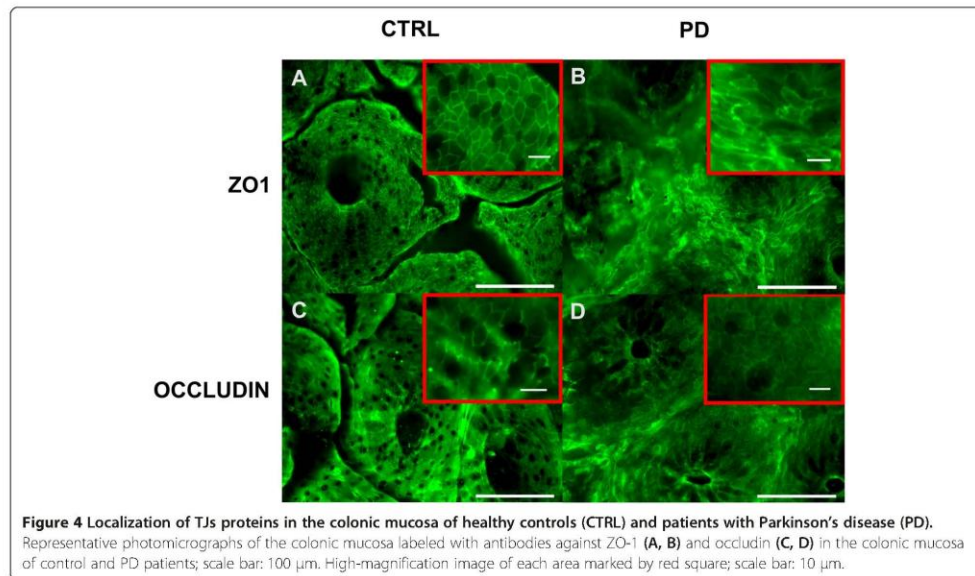


observed in the remaining control subject and in 8/31 PD samples (Figure 4 and Additional file 1). An increased staining of occludin in the cytoplasm of colonic enterocytes, suggestive of protein internalization, was observed in PD samples as opposed to the healthy group where occludin was mostly located in the TJs (Figure 4C and D). Worthy of note was the presence of moderate to severe TJs disorganization in the 5 patients who had never received levodopa, suggesting that the altered TJs morphology was not related to chronic levodopa intake (Additional file 2 and Table 1).

Discussion

The TJs are intercellular protein complex located at the apical portions of the lateral membranes of epithelial cells which play a key role in the regulation of IEB paracellular permeability. They are composed of transmembrane proteins, such as claudins and occludin and a wide spectrum of cytosolic proteins among which is ZO-1 [1]. By showing a decrease in occludin expression along with TJs disorganization, our study is the first to

provide evidence that the IEB is structurally altered in PD. Previous studies have shown intestinal tissue expression and distribution of occludin to be markedly decreased in patients with intestinal permeability disorders, including inflammatory bowel disease [28] and irritable bowel syndrome [6]. Recent data from genetic and epidemiological studies provided support for an association between diseases of the gastrointestinal tract and the susceptibility to developing PD. The CARD15 gene known to be associated with Crohn's disease is over-represented in patients with PD [29]; *vice versa*, the Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) gene, a causative PD mutation, was recently identified as a major susceptibility gene for Crohn's disease by genome-wide association studies [30]. Moreover, patients with irritable bowel syndrome are almost 50% more likely to develop PD than people who are free of this gastrointestinal disorder [31]. Our results show that the two disorders also share similarities at the molecular levels further supporting the assumption that irritable bowel syndrome may actually belong to early signs of gastrointestinal involvement in PD [32]. They also support



the hypothesis that the brain gut-axis might be critically involved in the pathophysiology of both disorders [7,33].

Studies of intestinal permeability in humans have mainly been carried out with *in vivo* techniques, usually with oral ingestion of various sugar probes and measurement of urinary excretion [12]. To date, the three studies that attempted to evaluate intestinal permeability in PD using this technique have provided only preliminary and conflicting results. Two of these studies focused on the lactulose/mannitol ratio, which evaluate small intestinal permeability. As a group, the 15 PD patients studied by Davies and collaborators had a significant increase in the lactulose/mannitol ratio when compared to age and sex matched controls, but individual results in both groups were highly overlapping [14]. Salat-Foix *et al.* showed that the lactulose/mannitol ratio was only marginally higher in 3 out of 12 PD patients [13]. In addition to lactulose/mannitol ratio, Forsyth *et al.* also used sucralose absorption for the assessment of colon permeability in 9 PD patients and 10 controls. They did not observe any difference in the lactulose/mannitol ratio between the two groups but found a significantly greater permeability to sucralose in PD subjects [15]. The inconsistent results on intestinal permeability in PD obtained with sugar probes prompted us to measure IEB permeability by another technique, namely Ussing chambers, in a larger sample size. Although less commonly used than sugar absorption, the Ussing chambers has proven to be a reliable and effective tool to measure IEB permeability of

gastrointestinal biopsies either paracellularly or transcellularly over a 3 hour period [34]. Using this approach, we showed that there were no significant differences in para- and transcellular permeabilities between PD subjects and controls. Nevertheless, the values of paracellular permeability as assessed by the sulfonic acid flux in Ussing chamber were highly heterogeneous between PD patients, some displaying a level comparable to controls while others had a more than a 2.5 fold increase in sulfonic acid flux. These data suggest that increased colonic permeability may be a feature for a subset of PD patients, as already reported when sugar probes were used [15]. The factors responsible for this heterogeneity still remain to be determined, as we did not observe any correlation between age, cumulative dose of L-Dopa disease duration and the severity of altered permeability.

On the surface, our results may seem contradictory, as the decreased expression of occludin observed in PD patients was not accompanied by changes in paracellular permeability. Occludin is a tetraspan protein with two extracellular loops, which homophilically interact with the adjacent cells [2]. Its role on IEB has been debated since its initial discovery in 1993 [35]. Initial studies strongly suggested that occludin was not required for the TJs formation or the maintenance of barrier function as occludin knockout mice lacked any noticeable defect in intestinal TJs morphology or barrier function [36]. This has been recently challenged in an elegant study

published by Al-Sadi *et al.* [37]. The purpose of their research was to better delineate the involvement of occludin in IEB by studying the transepithelial flux of various-sized probes after knocking down occludin both *in vitro* and *in vivo*. They showed that the occludin knock down caused a marked increase in the flux rates of macromolecules above 5 kDa such as inulin and dextran but had only modest effect on flux of smaller-sized probes under 200 Da such as mannitol and urea [36]. Fluorescein-5,6-sulfonic acid, which was used for the assessment of paracellular permeability in our study has a molecular weight of 400 Da, likely to be too small for detecting defects in IEB permeability induced by a mere down regulation of occludin. This may explain the lack of significant changes in IEB permeability observed in PD patients in our study in spite of the occurrence of structural changes.

The question arises as to what might be the clinical relevance of our experimental findings. A current theory, the so-called Braak's theory, assumes that PD originates in the gastrointestinal tract [11]. Braak and co-workers suggested that the appearance of Lewy pathology occurs in the earliest stage of PD in both the enteric nervous system and the dorsal motor nucleus of the vagus [11,38]. This led Braak to postulate that a pathogen may breach the IEB to trigger Lewy pathology in the terminal axons of the enteric neurons, further spreading to the central nervous system via the vagal preganglionic innervation of the gut [11,39]. In light of these considerations, our results demonstrating altered intestinal TJ structure in PD gain in importance as the down regulation of occludin may favor the entry of a putative pathogen. This must be however balanced, as the stomach in contrast to the colon appears to be the most suitable target for the pathologic insult to occur in Braak's scenario. Several studies have indeed described that Lewy pathology is distributed following a rostro-caudal gradient in PD, with the lower esophagus and stomach having the greatest involvement and the colon and rectum the lowest [9,10], a distribution that parallels the vagal innervation of the gastrointestinal tract [40]. Further studies are therefore warranted to analyze the mucosal barrier permeability and morphology in gastric and duodenal samples from PD patients.

Conclusions

In conclusion, we provide evidence for the first time that morphological changes in the IEB occur in PD patients. Our results further reinforce the possible role of the gastrointestinal tract in the pathophysiology of PD. Further work is needed to determine if occludin down regulation in the gut might facilitate the spreading of PD pathology in the enteric nervous system and in the brain.

Additional files

Additional file 1: Percentage of morphologically normal crypts in the colonic mucosa of healthy controls (CTRL) and patients with Parkinson's disease (PD).

Additional file 2: Localization of TJs proteins in the colonic mucosa of the 5 with Parkinson's disease (PD) who had never received levodopa. Scale bar: 100 μ m.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (Rapid Response Innovation Award 2013) and France Parkinson to PD. LLV is supported by a grant from Nantes University Hospital (Appel d'offre interne 2012, Grant number RC12_0264) and France Parkinson. TC is supported by a grant from centre dentraide et de coordination des associations de parkinsoniens (CECAP).

Author details

¹Inserm U913, 1 rue Gaston Veil, Nantes F-44035, France. ²University Nantes, Nantes F-44093, France. ³CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes F-44093, France. ⁴Inserm, CIC-04, Nantes F-44093, France. ⁵CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes F-44093, France. ⁶Inserm, UMR957, Nantes F-44093, France. ⁷CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes F-44093, France.

Received: 8 February 2015 Accepted: 10 February 2015

Published online: 10 March 2015

References

- Maichlindo AM, Graham WW, Turner JR (2010) Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 5:119–44
- Suzuki T (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 70:631–59
- Peeters M, Ghooys Y, Maes B, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G et al (1994) Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 39:2170–6
- Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, McEree C, Delahunty T, Dadufalza VD et al (1989) Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 97:927–31
- Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL et al (2009) Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 58:196–201
- Bertaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Ledcère S, Antonietti M, Gourcerol G et al (2011) The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol* 106:2165–73
- 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* 77:1761–7
- Cloud LJ, Greene JG (2011) Gastrointestinal features of Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11:379–84
- 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 neuropathologica* 76:217–21
- Beach TG, Adler CH, Sue LJ, Vedders L, Lue L, White III CL et al (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta neuropathologica* 119:689–702
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 396:67–72
- Hollander D (1999) Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* 1:410–6
- Salat-Foix D, Tran K, Ranawaya R, Meddings J, Suchowersky O (2012) Increased intestinal permeability and Parkinson disease patients: chicken or egg? *Can J Neurol Sci* 39:185–8

14. Davies KN, King D, Billington D, Barrett JA (1996) Intestinal permeability and orocaecal transit time in elderly patients with Parkinson's disease. *Postgrad Med J* 72:164–7
15. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA et al (2011) Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* 6:e28032
16. Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ (2001) Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology* 57:1497–9
17. Parkkinen L, O'Sullivan SS, Kuoppamaki M, Collins C, Kallis C, Holton JL et al (2011) Does levodopa accelerate the pathologic process in Parkinson disease brain? *Neurology* 77:1420–6
18. Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014; doi:10.1111/jnc.12742.
19. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M et al (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 22:e11–4
20. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H et al (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 14:1481–8
21. Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA et al (2003) Changes in chemical coding of myenteric neurons in ulcerative colitis. *Gut* 52:84–90
22. Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisie CL, Galmiche JP et al (2003) Human submucosal neurons regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15:239–42
23. Cameron HL, Perdue MH (2007) Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 19:47–56
24. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM et al (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 5:e12728
25. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Des Varannes SB, Neunlist M, Derkinderen P (2012) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 45:305–9
26. Ciana A, Meier K, Daum N, Gerbes S, Veith M, Lehr CM et al (2010) A dynamic ratio of the alpha+ and alpha- isoforms of the tight junction protein ZO-1 is characteristic of Caco-2 cells and correlates with their degree of differentiation. *Cell Biol Int* 34:669–78
27. Willott E, Balda MS, Heintzelman M, Jameson B, Anderson JM (1992) Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol* 262:C1119–24
28. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N et al (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G216–28
29. Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Juzwiak S, Kurzawski G et al (2007) CARD15 variants in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Res* 57:473–6
30. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD et al (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40:955–62
31. Lai S-W, Liao K-F, Lin C-L, Sung F-C (2014) Irritable bowel syndrome correlates with increased risk of Parkinson's disease in Taiwan. *Eur J Epidemiol* 29:57–62, doi:10.1007/s10654-014-9878-3
32. Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, Pellene A, Calandra CR, Gutiérrez C et al (2013) Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol* 260:1332–8
33. Coss-Adame E, Rao SSC (2014) Brain and gut interactions in irritable bowel syndrome: new paradigms and new understandings. *Curr Gastroenterol Rep* 16:379
34. Wallon C, Braaf Y, Wolving M, Wolving M, Olaison G, Söderholm JD (2005) Endoscopic biopsies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon. *Scand J Gastroenterol* 40:586–95
35. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S et al (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777–88
36. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H et al (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11:4131–42
37. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T (2011) Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G1054–64
38. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211
39. Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 110:517–36
40. Hopkins DA, Bieger D, deVente J, Steinbusch WM (1996) Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog Brain Res* 107:79–96

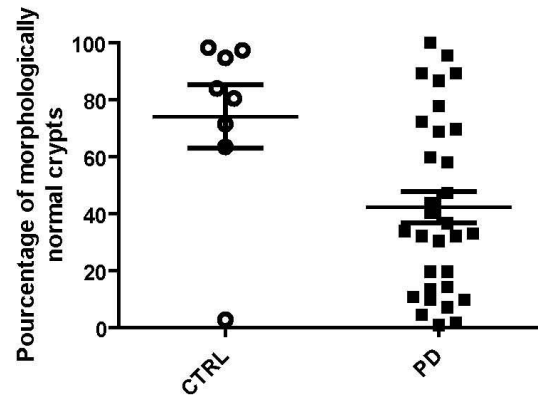
Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

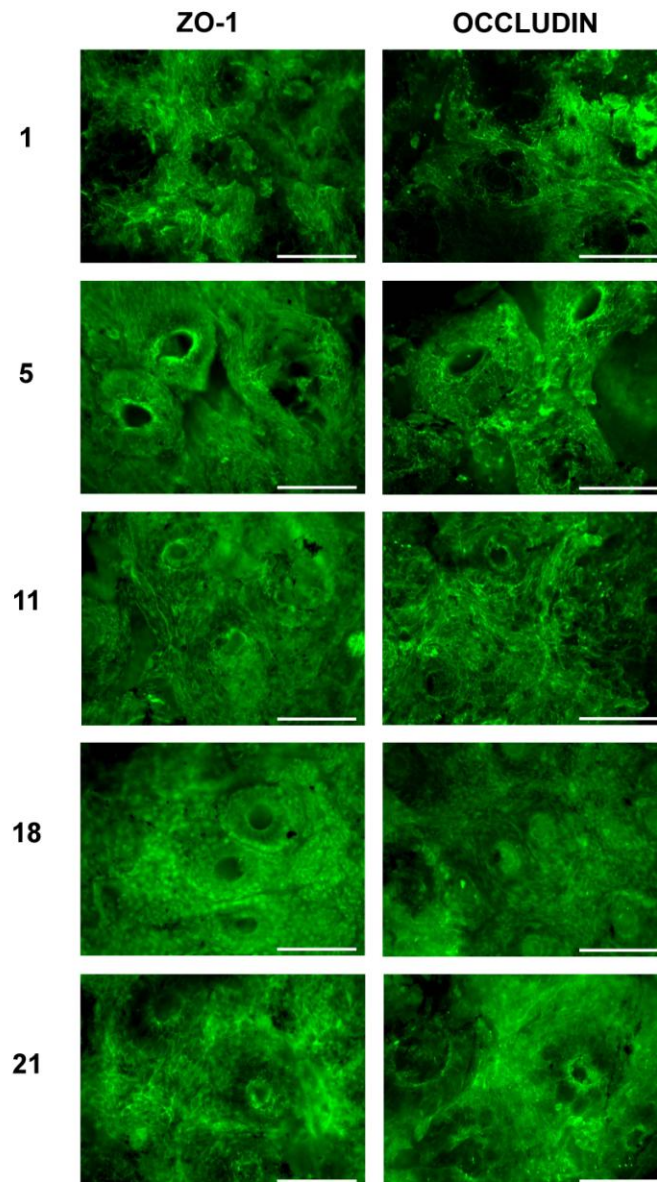
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Discussion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que l'UNGE est modifiée de différentes manières dans la MP.

Les résultats de notre première étude ainsi que ceux obtenus précédemment par notre équipe montrent que l'expression de la GFAP est augmentée aussi bien au niveau des transcrits que des protéines dans les CGE des biopsies de muqueuses épithéliales coliques de nos patients parkinsoniens (Devos *et al.* 2013). Par analogie avec le SNC il a été proposé que l'augmentation de l'expression de la GFAP dans le TD traduit une activation des CGE, un phénomène appelé réactivité gliale ou gliose. Ces dernières années, plusieurs études ont montré que les CGE sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie du TD (Neunlist *et al.* 2013) et particulièrement dans la régulation de l'inflammation intestinale (Cabarrocas *et al.* 2003; Rühl *et al.* 2005). Des modifications morphologiques et biochimiques des CGE sont observées dans le TD des patients atteints de MICI (Cornet *et al.* 2001; von Boyen *et al.* 2011) et une ablation sélective de la glie provoque une inflammation intestinale importante chez le rongeur (Bush *et al.* 1998; Cornet *et al.* 2001; Aube *et al.* 2006). Des expériences *in vitro* sur des cultures de CGE montrent que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α augmentent l'expression de la GFAP (von Boyen *et al.* 2004) et qu'une fois activées les CGE peuvent sécréter de l'IL-6 (Rühl *et al.* 2001). Concernant la MP nous avons récemment montré que les niveaux d'expression des principales cytokines pro-inflammatoires sont augmentés et sont corrélés avec l'expression des ARNm de la GFAP dans les biopsies coliques des patients parkinsoniens (Devos *et al.* 2013). En démontrant la présence d'une réaction gliale dans le TD des parkinsoniens, nos résultats supportent le fait que la MP n'est pas restreinte au SNC mais qu'elle est plutôt une pathologie systémique qui affecte le système nerveux périphérique autonome et en particulier le SNE (Beach *et al.* 2009). Nos données renforcent également le rôle de l'inflammation périphérique associée à l'activation gliale dans l'initiation et la progression de la maladie (Lema Tomé *et al.* 2012).

Différents degrés d'activation astrocytaire ont été rapportés dans le cerveau de syndromes parkinsoniens comme la MP, la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et l'atrophie multi-système (AMS). Dans la MP, l'astroglie est généralement considérée comme relativement peu importante, avec malgré tout la présence de dépôts d'alpha-synucléine dans les astrocytes, alors qu'elle est plus marquée dans d'autres syndromes parkinsoniens dégénératifs que sont la PSP et l'AMS (Song *et al.* 2009). Pendant ce travail de thèse nous avons montré que, contrairement à la MP, les niveaux de GFAP dans les biopsies coliques des patients atteints de PSP ou d'AMS sont comparables voir plus bas que

les témoins. Cette absence de surexpression de la GFAP dans le TD des patients atteints de PSP et d'AMS est un argument contre la présence d'une entérogliose et suggère que la PSP et l'AMS sont des pathologies restreintes au SNC. Ceci est d'ailleurs supporté par les quelques études autopsiques disponibles qui ont montré l'absence de lésions pathologiques dans le système nerveux périphérique dans le cadre de ces 2 pathologies (Wakabayashi *et al.* 2010; Pouclet *et al.* 2012a).

Concernant l'expression des isoformes de la GFAP, nos résultats obtenus en RTqPCR et Western blot sont concordants et montrent que la GFAP κ , qui est l'isoforme la plus récemment découverte (Blechingberg *et al.* 2007), est l'isoforme principale que l'on retrouve dans les CGE. Des données à mettre en contraste avec celles obtenues à partir d'échantillons de cerveau humain montrant que le niveau d'expression des transcrits de la GFAP κ atteint 1,1% de celui de la GFAP α (Kamphuis *et al.* 2014). La GFAP κ a une queue carboxy-terminale différente de celles de la GFAP α et de la GFAP δ . Il a été suggéré que ces différences pourraient avoir des conséquences physiologiques puisque la GFAP κ forme difficilement des filaments homomériques contrairement à la GFAP α (Blechingberg *et al.* 2007). L'impact physiologique sur le TD d'un haut niveau d'expression de la GFAP κ dans les CGE n'est pas encore connu et nécessite de plus amples études. De plus il reste à déterminer si les CGE du plexus myentérique qui ne sont pas accessibles par la technique classique des biopsies intestinales expriment de la même manière préférentiellement la GFAP κ .

Les acides aminés phosphorylés localisés sur la tête amino-terminale de la GFAP, à savoir la thréonine 7, les sérines 8, 13, 17 et 34, sont impliqués dans la régulation de l'assemblage de la protéine en filament (Inagaki *et al.* 1994). La phosphorylation de la GFAP à l'extrémité amino-terminale induit le désassemblage des filaments intermédiaires et sa déphosphorylation restaure le potentiel d'assemblage de la protéine (Takemura *et al.* 2002). Etant donné que l'intégrité du cytosquelette est essentielle pour le bon fonctionnement des astrocytes, il a été suggéré que la phosphorylation de la GFAP pourrait être un mécanisme de régulation important dans les maladies du SNC. Malgré cela, peu d'études se sont intéressées aux niveaux de phosphorylation de la GFAP en conditions pathologiques. En utilisant une approche par électrophorèse bi-dimensionnelle, Korolainen *et al.* ont montré une augmentation de la phosphorylation de la GFAP dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer (Korolainen *et al.* 2005). Seulement 2 études ont examiné la phosphorylation de la GFAP à travers l'utilisation d'anticorps phospho-spécifiques dans des traumatismes cérébraux ou des maladies neurodégénératives. La première a montré par une analyse en phosphoprotéomique que la phosphorylation de la GFAP sur la sérine 13 est augmentée

chez les individus avec une dégénérescence lobaire fronto-temporale, un résultat validé par des immunoblots avec un anticorps spécifique de ce site de phosphorylation sur la GFAP (Herskowitz *et al.* 2010). Plus récemment, Sullivan *et al.* ont démontré dans le cerveau du cochon que l'hypoxie est associée à une augmentation de la phosphorylation de la sérine 13 de la GFAP (Sullivan *et al.* 2012). Nos résultats montrant une hypophosphorylation sur ce même site semblent donc être en contradiction avec ces observations. Néanmoins, étant donné le rôle de la phosphorylation de la GFAP dans la plasticité du cytosquelette glial, on pourrait soutenir que les cellules gliales répondent de façons différentes selon le contexte neurodégénératif (Figure 25) et que, par contraste avec la maladie d'Alzheimer et la dégénérescence lobaire fronto-temporale, l'activation gliale dans la MP est associée à une chute de la phosphorylation de la GFAP. À cet égard il est important de noter que l'état de phosphorylation de la GFAP n'a pas encore été étudié dans le cerveau des patients parkinsoniens. Comme suite logique à notre étude il serait donc intéressant d'étudier si la GFAP est hypophosphorylée dans les astrocytes centraux des parkinsoniens.

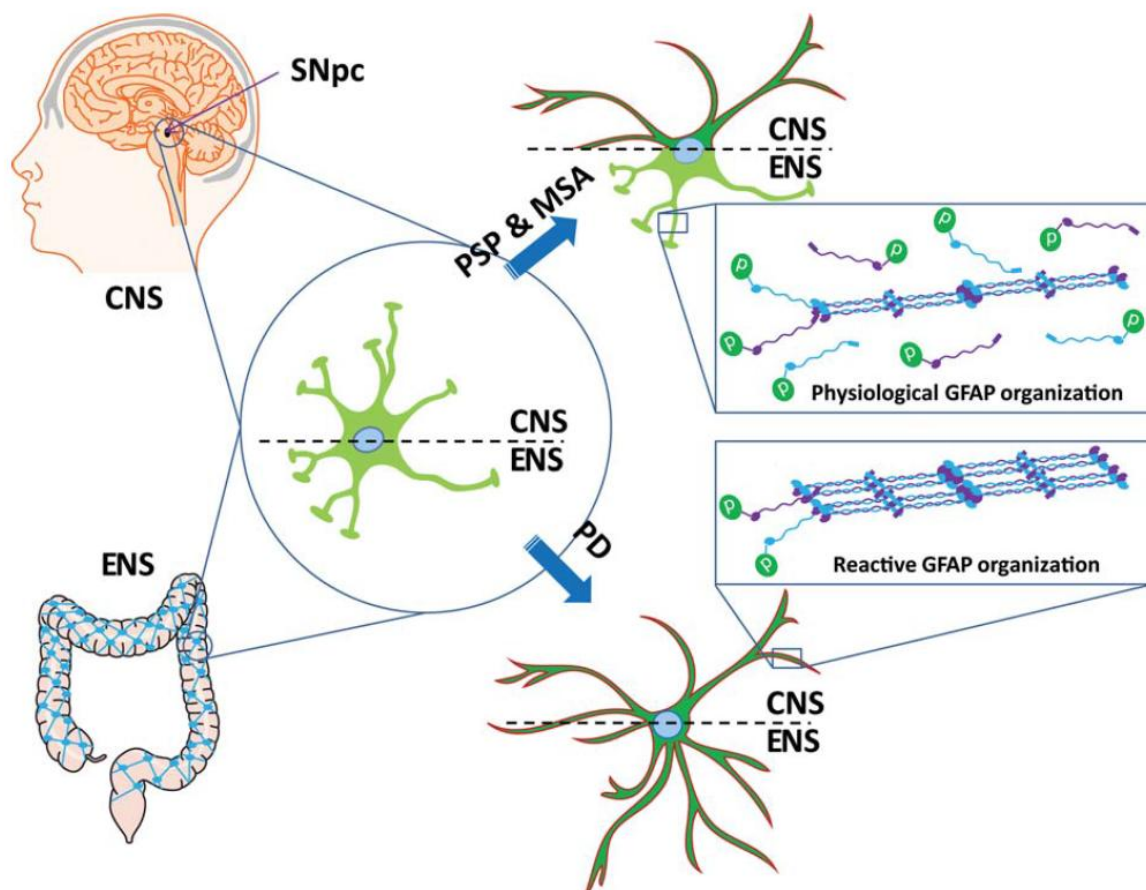


Figure 25 : Représentation schématique des modifications de la phosphorylation de la GFAP dans la MP. Une activation gliale par des modifications morphologiques et biochimiques des astrocytes a été décrite dans le SNC dans la MP, La PSP et l'AMS (cellules vertes foncées). Dans le SNE, les CGE

présentent des modifications biochimiques importantes dans la MP (cellules vertes foncées) mais pas dans la PSP et l'AMS (cellules vertes claires). Les modifications biochimiques observées sont illustrées par le niveau de phosphorylation de la GFAP. En conditions physiologiques tout comme dans le SNE en cas de PSP et d'AMS, le niveau de phosphorylation de la GFAP commande l'état d'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des formes solubles de GFAP en filaments et protège la protéine de la dégradation (physiological GFAP organization). Dans la MP, la GFAP entérique est hypophosphorylée et a donc une plus grande tendance à s'assembler et une plus grande sensibilité au clivage protéique (reactive GFAP organization). Nous proposons que les modifications de la phosphorylation de la GFAP régulent la plasticité des filaments gliaux et éventuellement les fonctions des CGE.

Dans le contexte de l'hypothèse de Braak, nos données sur l'activation des CGE associées à la présence d'une inflammation de bas grade dans les biopsies coliques des parkinsoniens renforcent le rôle potentiel du TD et du SNE dans l'initiation et/ou la progression de la MP. En effet Braak *et al.* ont suggéré que la pathologie de Lewy touchait le noyau moteur dorsal du nerf vague et le SNE précocement au cours de l'évolution de la maladie (Braak *et al.* 2003). Ces observations conduisirent Braak à proposer l'hypothèse selon laquelle un pathogène présent dans l'environnement passerait la BEI et déclencherait les premières lésions au niveau des neurones entériques du plexus sous-muqueux avant que celles-ci ne se propagent au plexus myentérique pour gagner ensuite progressivement le SNC en empruntant l'innervation vagale du TD (Braak *et al.* 2006). Si cette hypothèse est vraie, ceci implique que la BEI des parkinsoniens est plus perméable pour laisser passer cet éventuel agent pathogène. C'est la raison pour laquelle notre second travail a porté sur la caractérisation de l'atteinte de la BEI en nous intéressant plus particulièrement aux perméabilités para et transcellulaires et à l'expression des protéines des jonctions serrées. En montrant une diminution de l'expression de l'occludine avec une désorganisation des jonctions serrées, notre étude est la première à mettre en évidence que la BEI est structurellement altérée dans la MP. Des travaux précédents ont montré que l'expression et la distribution de l'occludine est nettement diminuée chez les patients avec des altérations de la perméabilité intestinale comme cela est noté dans les MICI et le syndrome de l'intestin irritable (Gassler *et al.* 2001; Bertiaux-Vandaële *et al.* 2011). Des données récentes d'études génétiques et épidémiologiques apportent des arguments en faveur d'un lien entre des pathologies intestinales et la MP. Le gène CARD15 connu pour être associé à la maladie de Crohn est sur-représenté dans la MP (Bialecka *et al.* 2007). À l'inverse, le gène LRRK2 (*Leucin Reach Repeated Kinase 2*), dont la mutation induit une MP, a été récemment identifié comme un gène majeur de susceptibilité pour la maladie de Crohn (Barrett *et al.* 2008). De plus les patients avec un syndrome de l'intestin irritable présentent 50% de risque de développer une MP en comparaison aux personnes ne présentant pas de troubles

gastrointestinaux (Lai *et al.* 2014). Nos résultats montrent également que ces 2 pathologies partagent des similarités jusqu'au niveau moléculaire ce qui permet de penser que le syndrome de l'intestin irritable pourrait faire partie des signes digestifs précoces impliqués dans la MP (Cersosimo *et al.* 2013). Ils supportent également l'hypothèse que l'axe intestin-cerveau pourrait bien être impliqué de façon critique dans la physiopathologie de ces 2 maladies (Derkinderen *et al.* 2012; Coss-Adame and Rao 2014).

Les études de la perméabilité épithéliale intestinale chez l'homme ont principalement été menées *in vivo* en mesurant l'excrétion urinaire de différents sucres non métabolisables après ingestion (Hollander 1999). À ce jour les 3 études qui se sont intéressées à évaluer la perméabilité intestinale dans la MP en utilisant cette technique ont montré des résultats souvent préliminaires et discordants. Deux de ces études se sont focalisées sur le ratio lactulose/mannitol, qui permet d'évaluer la perméabilité de l'intestin grêle. Les 15 patients étudiés par Davies *et al.* avaient une augmentation significative de ce ratio comparés au témoins mais les résultats individuels de chaque groupe se chevauchaient (Davies *et al.* 1996). Salat-Foix *et al.* ont montré un ratio lactulose/mannitol seulement marginalement plus haut chez 3 parkinsoniens sur 12 (Salat-Foix *et al.* 2012). En plus de ce ratio, une autre étude a également utilisé le sucralose pour évaluer la perméabilité du côlon chez 9 parkinsoniens et 10 témoins. Elle ne met pas en évidence de modification du ratio lactulose/mannitol entre les 2 groupes mais montre une augmentation significative de la perméabilité au sucralose chez les parkinsoniens (Forsyth *et al.* 2011). En raison de l'inconsistance et de la variabilité des résultats obtenus avec les sucres non métabolisables, nous avons utilisé une autre approche, les chambres de Ussing, pour mesurer la perméabilité de la BEI. Bien que moins fréquemment utilisées, les chambres de Ussing permettent d'évaluer la perméabilité paracellulaire et transcellulaire de biopsies intestinales sur une période de 3h (Wallon *et al.* 2005). Nous n'avons pas observé de modification des perméabilités para et transcellulaires en chambre de Ussing chez nos parkinsoniens par rapport à nos sujets témoins. Néanmoins les valeurs obtenues par mesure du flux d'acide sulfonique se sont révélées très hétérogènes parmi les patients parkinsoniens. Certains présentaient un flux similaire aux témoins alors que d'autres présentaient un flux jusqu'à 2,5 fois plus élevé. Ces données suggèrent que l'augmentation de perméabilité colique pourrait être une caractéristique chez un sous-groupe de patients comme cela a été suggéré quand les sucres non métabolisables étaient utilisés (Forsyth *et al.* 2011). Le ou les facteur(s) responsables de cette hétérogénéité restent toutefois à identifier car nous n'avons pas observé de corrélation entre l'âge, la dose cumulée de L-Dopa, la durée d'évolution de la maladie et le degré d'altération de la perméabilité.

À première vue nos résultats sur la BEI des parkinsoniens peuvent paraître contradictoires puisque la diminution d'expression de l'occludine que nous observons chez les patients parkinsoniens n'est pas accompagnée d'une modification de la perméabilité paracellulaire. L'occludine est une protéine des jonctions serrées comportant 2 boucles extracellulaires qui interagit de façon homophile avec les cellules adjacentes (Suzuki 2013). Son rôle dans la BEI est débattu depuis sa découverte en 1993 (Furuse *et al.* 1993). D'une manière étonnante les premières études suggéraient que l'occludine n'était pas impliquée dans la formation des jonctions serrées et la maintenance de la BEI étant donné que les souris occludine^{-/-} ne présentaient pas d'anomalies notables de la BEI ou des jonctions serrées (Saitou *et al.* 2000). Cependant une étude plus récente montre que les souris occludine^{-/-} ont une augmentation importante de la perméabilité aux macromolécules de plus de 5kDa comme l'inuline ou le dextran sans avoir de modification de la perméabilité des petites molécules de moins de 200Da comme le mannitol ou l'urée (Al-Sadi *et al.* 2011). La molécule que nous avons utilisée pour les mesures de perméabilité paracellulaire, l'acide sulfonique couplé à la fluorescéine, a un poids moléculaire de 400Da. Cette taille paraît donc incompatible avec la détection d'altérations de la perméabilité de la BEI induites par une baisse d'expression de l'occludine. Cela pourrait expliquer le manque de modifications significatives de perméabilité observé chez les parkinsoniens de notre étude malgré la présence des altérations structurelles.

En repositionnant ces données face à l'hypothèse de Braak, la détérioration de la structure des jonctions serrées chez les parkinsoniens gagne en importance puisque la sous-expression de l'occludine pourrait favoriser l'entrée d'un pathogène. Cependant en gardant à l'esprit que les pathologies de Lewy sont distribuées en suivant un gradient rostro-caudal avec le tiers inférieur œsophagien et l'estomac les plus touchés par les lésions et le côlon et le rectum les moins atteints (Wakabayashi *et al.* 1988; Beach *et al.* 2009) les parties hautes du TD semblent être plus enclines à être ciblées par un éventuel déclencheur environnemental comme le voudrait le scénario de Braak. Les prochaines études devront ainsi s'attacher à étudier la structure et la perméabilité de la BEI tout comme l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des marqueurs gliaux au niveau d'échantillons de muqueuses gastriques et duodénales de patients parkinsoniens.

Conclusion

Bien que le rôle physiopathologique de l'UNGE dans la MP reste encore à définir en étudiant plus profondément son atteinte, il existe un besoin pressant de biomarqueurs non seulement pour différencier la MP parmi d'autres pathologies neurodégénératives mais aussi pour évaluer la progression et la sévérité de la maladie. Malgré des avancées importantes dans le domaine de la neuro-imagerie, il n'existe pas encore de biomarqueur validé pour la MP. Les observations montrant que la MP n'est pas limitée au SNC mais qu'elle est également étendue au système nerveux périphérique et notamment au SNE donnent de nouvelles opportunités de développement de nouveaux biomarqueurs pour cette pathologie. Jusqu'à maintenant la recherche de ces nouveaux biomarqueurs dans le SNE s'est focalisée sur l'identification des agrégats d'alpha-synucléine (Visanji *et al.* 2014). L'identification de modifications des CGE ainsi que d'altérations de la BEI au niveau moléculaire dans la MP ouvre la voie à la découverte de biomarqueurs entériques, qui pourraient aller au-delà de la simple mise en évidence des pathologies de Lewy. Au regard de son atteinte précoce dans le développement de la maladie, l'UNGE pourrait donc être considérée comme une source de biomarqueurs précoces de la MP.

Articles de revue

Article 3 : Le système nerveux entérique : une fenêtre sur l'atteinte du système nerveux central dans la maladie de Parkinson

Clairembault T., Leclair-Visonneau L., Derkinderen P., Neunlist M., Coron E., Lebouvier T. (2013) The enteric nervous system : a window toward neurodegeneration in Parkinson's disease. *PraNeu.* doi: 10.1016/j.praneu.2013.10.009

Le système nerveux entérique : une fenêtre sur l'atteinte du système nerveux central dans la maladie de Parkinson

The enteric nervous system: A window toward neurodegeneration in Parkinson's disease

^aInserm U913, CHU de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes, France

^bInserm CIC-04, CHU de Nantes, Maison de la recherche, 63, quai magellan, 44021 Nantes cedex 1, France

^cFaculté de médecine, université de Nantes, 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes cedex 1, France

^dHôtel-Dieu, institut des maladies de l'appareil digestif, CHU de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex 1, France

^eService de neurologie, hôpital Nord Laennec, CHU de Nantes, boulevard Jacques-Monod, Saint-Herblain, 44093 Nantes cedex 1, France

16

T. Clairembault^{a,b,c,d}

L. Leclair-Visonneau^{a,b,c,d,e}

P. Derkinderen^{a,b,c,d,e}

M. Neunlist^{a,b,c,d}

E. Coron^{a,b,c,d}

T. Lebouvier^{a,b,c,d,e}

Q1

RÉSUMÉ

Le système nerveux entérique (SNE) est un réseau neuronal présent sur l'ensemble du tractus digestif, qui est touché par le processus pathologique chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens. Nous avons récemment montré que le SNE pouvait être analysé du vivant du patient en utilisant des biopsies digestives réalisées en routine. Ceci permet d'envisager le SNE comme source originale de biomarqueurs histopathologiques de la maladie de Parkinson.
© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

SUMMARY

The enteric nervous system (ENS) is an integrative neuronal network distributed along the entire digestive tract that is affected by Lewy pathology in almost all Parkinson's disease (PD) patients. We have recently shown that the ENS can be readily analyzed using routine colonic biopsies. This led us to propose that the ENS is a unique window to assess the neuropathology in living PD patients and may therefore be exploited to improve our understanding and management of PD.
© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

18 **D'**un point de vue pathologique, la mala-
19 die de Parkinson (MP) est classique-
20 ment caractérisée par l'existence
21 d'une perte des neurones dopaminergiques
22 de la substance noire associée à la présence
23 d'inclusions intraneuronales, les corps et pro-
24 longements de Lewy dans les neurones sur-
25 vivants (Dickson et al., 2009). Il est toutefois
26 désormais bien établi que la pathologie de
27 Lewy ne se limite pas à la substance noire ni
28 au système nerveux central (SNC) mais qu'elle
29 touche aussi des systèmes nerveux périphé-
riques (Beach et al., 2009). Parmi ces réseaux

neuronaux périphériques, le système nerveux
entérique (SNE) a reçu une attention toute par-
ticulière car (i) il a une organisation qui est
proche du SNC, (ii) il est touché par le proces-
sus pathologique chez la quasi-totalité des
patients parkinsoniens, (iii) il peut être facile-
ment analysé du vivant du patient en utilisant
des biopsies digestives réalisées en routine
(revue dans Derkinderen et al., 2011). Ceci
permet d'envisager le SNE comme source ori-
ginale de biomarqueurs de la MP, permettant
d'appréhender directement le processus
pathologique du vivant du patient.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.praneu.2013.10.009>

Pour citer cet article : Clairembault T, et al. Le système nerveux entérique : une fenêtre sur l'atteinte du système nerveux central dans la maladie de Parkinson. Pratique Neurologique – FMC (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.praneu.2013.10.009>

Mots clés

Maladie de Parkinson
Système nerveux
entérique
Côlon
Biopsies
Biomarqueur

Keywords

Parkinson's disease
Enteric nervous system
Colon
Biopsies
Biomarker

Auteur correspondant : P.
Derkinderen, Inserm U913,
CHU de Nantes, 1, place
Alexis-Ricordeau, 44093
Nantes, France.
Adresses e-mail :
derkinderenp@yahoo.fr,
pascal.derkinderen@chu-nantes.fr (P. Derkinderen)

Faites le point

T. Clairembault et al.

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE, UN SECOND CERVEAU

Le SNE est un réseau neuronal distribué tout le long du tube digestif, composé de plus de 100 millions de neurones, soit autant que dans la moelle épinière. Cette subdivision du système nerveux végétatif est parfois appelée « le second cerveau » car elle présente de nombreuses similitudes avec le SNC et est capable de réguler de façon autonome les fonctions digestives, en partie indépendamment du SNC (Benarroch, 2007). Le SNC exerce toutefois une régulation importante sur le SNE par des afférences et efférences sympathiques (issues du ganglion sympathique prévertébral) et parasympathiques (issues du noyau dorsal moteur du vague et du noyau parasympathique sacré) (Benarroch, 2007). Le SNE est organisé en deux plexus principaux, le plexus myentérique (Auerbach), qui contrôle essentiellement la motilité digestive, et le plexus sous-muqueux (Meissner) qui est principalement impliqué dans la régulation de la sécrétion (Schemann et Neunlist, 2004). Les plexus myentérique et sous-muqueux sont organisés en ganglions reliés par des fibres inter-ganglionnaires (Fig. 1). Au sein des ganglions, les neurones entériques sont fonctionnellement variés et plus de 40 messagers intercellulaires ont été identifiés à ce jour dans le SNE. Les différents neurotransmetteurs synthétisés par les neurones entériques définissent leur codage neurochimique et déterminent leur rôle physiologique (Schemann et Neunlist, 2004). Ainsi, le peptide vasoactif intestinal et le monoxyde d'azote ont un effet inhibiteur sur la motilité

digestive et l'acétylcholine a un effet prokinétique. À côté des neurones entériques, les ganglions contiennent des cellules gliales entériques qui partagent les propriétés morphologiques et fonctionnelles des astrocytes du SNC (Gulbransen et Sharkey, 2012).

59
60
61
62
63

LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE EST ATTEINT FRÉQUEMMENT ET PRÉCOCEMENT PAR LA PATHOLOGIE DE LEWY AU COURS DE LA MALADIE DE PARKINSON

Les premières descriptions de pathologie de Lewy dans le SNE remontent aux années 1980. Des corps et prolongements de Lewy ont été mis en évidence dans le plexus myentérique et à un moindre degré dans le plexus sous-muqueux du côlon, du tiers inférieur de l'œsophage et de l'estomac (Qualman et al., 1984 ; Kupsky et al., 1987 ; Wakabayashi et al., 1988). Depuis, plusieurs travaux autopsiques de grande envergure ont été menés afin de mieux caractériser l'atteinte du SNE au cours de la MP. Une étude réalisée par Thomas Beach et al. a montré que les lésions du SNE sont présentes chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens et sur l'ensemble du tube digestif, du tiers inférieur de l'œsophage au rectum (Beach et al., 2009). Ces lésions sont toutefois réparties selon un gradient rostro-caudal, les corps et prolongements de Lewy étant plus denses dans le tiers inférieur de l'œsophage que dans le côlon (Beach et al., 2009). Nous avons récemment montré en utilisant des biopsies réalisées au cours d'une colonoscopie qu'il existe aussi un gradient rostro-caudal dans le côlon, la pathologie de Lewy étant plus dense dans le côlon droit que dans le rectum. Des expériences complémentaires sur ces mêmes prélèvements autopsiques ont montré qu'il n'y a pas de perte neuronale significative dans les plexus myentérique et sous-muqueux au cours de la MP et que la pathologie de Lewy n'affecte pas préférentiellement un type de neurone entérique (Annerino et al., 2012). S'il ne fait donc désormais aucun doute que la grande majorité des patients parkinsoniens a des corps de Lewy « digestifs », la précocité de cette atteinte est encore sujette à débat. L'hypothèse d'une atteinte précoce du SNE a été suggérée après les publications d'Heiko Braak en 2003 et 2006 (Braak et al., 2003, 2006). Les études neuropathologiques menées par cet anatomiste allemand ont permis de mettre en évidence une progression temporo-spatiale ascendante des corps de Lewy dans le tronc cérébral et l'encéphale (Braak et al., 2003). Ces travaux suggèrent que les premières lésions de la MP apparaîtraient dans le noyau dorsal du vague, bien avant l'atteinte de la substance noire compacte. Le nerf vague innervant la quasi-totalité du tractus digestif, il n'y avait qu'un pas pour envisager que le SNE est la première structure touchée par le processus pathologique (Braak et al., 2006). Bien que cette hypothèse ait reçu de nombreux échos favorables, les données à la fois anatomiques et expérimentales sont encore trop préliminaires pour affirmer que le SNE est la première structure nerveuse touchée au cours de l'évolution de la MP (Jellinger, 2008).

64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114

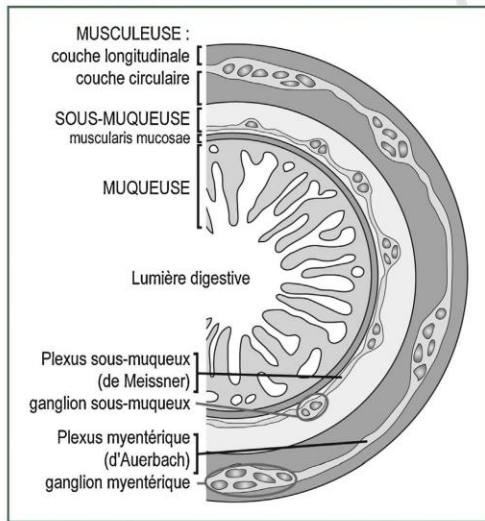


Figure 1. Représentation schématique du système nerveux entérique.

2

Pour citer cet article : Clairembault T, et al. Le système nerveux entérique : une fenêtre sur l'atteinte du système nerveux central dans la maladie de Parkinson. Pratique Neurologique – FMC (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.praneu.2013.10.009>

115
116
117**LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE, UNE SOURCE ORIGINALE DE BIOMARQUEURS POUR LA MP**118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150

Malgré les progrès réalisés dans les domaines de la neuro-imagerie et de la biochimie, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de biomarqueur validé permettant de faire un diagnostic précoce ou de sévérité de la MP (Marek et al., 2008). La présence de pathologie de Lewy dans des tissus nerveux périphériques qui comme le SNE sont accessibles par biopsie permet d'envisager le développement de biomarqueurs originaux de la maladie (Lebouvier et al., 2010c).

Afin d'étudier les neurones entériques, nous avons mis au point une technique de microdissection des biopsies digestives. Contrairement à la technique d'analyse classique des biopsies digestives par inclusion en paraffine, notre méthode permet d'isoler l'ensemble du plexus sous-muqueux et de faire une analyse quantitative et morphologique des neurones qui le composent (Fig. 2) (Lebouvier et al., 2010a). En utilisant cette technique, nous avons pu mettre en évidence des prolongements de Lewy chez près de trois quarts des patients parkinsoniens (Lebouvier et al., 2010b), des anomalies qui ne sont pas retrouvées chez des témoins appariés en âge et chez des patients atteints d'atrophie multi-systématisée (Poucllet et al., 2012b). La charge lésionnelle en prolongements de Lewy des biopsies, évaluée par un score quantitatif, était corrélée à la sévérité de l'atteinte clinique : les patients avec une charge lésionnelle importante étaient ceux dont les signes axiaux (instabilité posturale, dysarthrie notamment) étaient les plus marqués (Lebouvier et al., 2010b). Ces signes axiaux traduisent habituellement la sévérité de la maladie et il est donc possible d'envisager l'utilisation de l'analyse des biopsies coliques comme biomarqueur de sévérité de la maladie.

Les anomalies du SNE au cours de la MP ne se limitent pas à la simple présence de pathologie de Lewy. En effet, nous avons pu montrer récemment que les patients parkinsoniens ont un niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires

(interleukine 6, *tumor necrosis alpha* et interféron gamma) et des marqueurs gliaux plus élevés dans leurs biopsies digestives que des témoins appariés en âge (Devos et al., 2012). Ces données sont à rapprocher de celles obtenues dans le SNC, qui montrent la présence d'une neuro-inflammation et d'une réaction gliale dans la substance noire et le striatum (Hirsch et al., 2012). Ceci suggère donc fortement que les anomalies observées dans le SNE des patients parkinsoniens vont bien au-delà des inclusions intraneuronales et qu'elles pourraient refléter dans leur intégralité les anomalies observées dans le SNC.

151
152
153
154
155
156
157
158
159
160**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

161

Le SNE n'est pas le seul tissu neuronal périphérique touché par le processus pathologique au cours de la MP et qui soit accessible par biopsie (Lebouvier et al., 2010c). Il a été ainsi proposé de pratiquer des biopsies cutanées et de glandes salivaires accessoires, mais jusqu'à présent l'analyse de ces prélèvements n'a pas permis de mettre en évidence la pathologie de Lewy avec une bonne sensibilité (moins de 20 %) (Miki et al., 2009 ; Folgoas et al., 2013). La sensibilité de près de 75 % des biopsies digestives est donc largement supérieure et pourrait être améliorée en augmentant le nombre de biopsies coliques analysées ou en utilisant des biopsies de tube digestif haut (Poucllet et al., 2012a). En effet, la densité de la pathologie de Lewy dans le tube digestif des patients parkinsoniens est distribuée selon un gradient rostro-caudal, avec une charge lésionnelle importante dans le bas œsophage et l'estomac, plus faible dans le côlon et le rectum (Beach et al., 2009). Enfin, il sera important d'améliorer les conditions de réalisation et d'analyse des biopsies digestives afin de proposer des études à plus grande échelle. Notre technique d'analyse des biopsies par microdissection nécessite qu'elles soient disséquées et fixées immédiatement après l'endoscopie par un personnel habitué à la technique (Lebouvier et al., 2010a), ce qui limite son développement en tant que

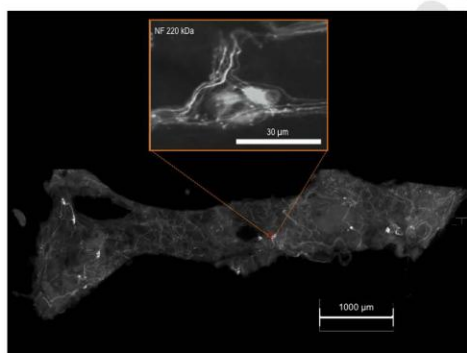
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184

Figure 2. Plexus sous-muqueux obtenu après microdissection de biopsie colique. Un marquage neuronal obtenu avec un anticorps dirigé contre les chaînes lourdes des neurofilaments (NF220) montre la présence de ganglions et un réseau interganglionnaire dense. Un ganglion (agrandissement) contient de 3 à 5 neurones en moyenne, une biopsie environ 150 neurones.

Points essentiels

- L'atteinte pathologique au cours de la maladie de Parkinson (MP) n'est pas restreinte à la perte neuronale nigro-striée. Elle concerne aussi les systèmes nerveux périphériques autonomes et en particulier le système nerveux entérique (SNE).
- L'étude du SNE permet de mettre en évidence la pathologie de Lewy du vivant des patients parkinsoniens, par le biais des biopsies digestives.
- Nous proposons que le SNE soit une source originale de biomarqueurs histopathologiques de la MP qui permettrait non seulement le diagnostic positif, mais aussi le suivi de la progression de la MP.

3

Pour citer cet article : Clairembault T, et al. Le système nerveux entérique : une fenêtre sur l'atteinte du système nerveux central dans la maladie de Parkinson. Pratique Neurologique – FMC (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.praneu.2013.10.009>

Faites le point

T. Clairembault et al.

- 185 biomarqueur potentiel. Une technique d'analyse des biopsies
186 qui pourrait être réalisée après leur congélation permettrait
187 d'envisager des études multicentriques à plus grande échelle
188 en facilitant les procédures de conservation et de transport des
189 prélèvements. Une éventualité est l'analyse du SNE par
190 électrophorèse bidimensionnelle, une technique qui s'est montrée
191 efficace dans la détection des formes pathologiques
192 d' α -synucléine du SNC.
- 193 **Déclaration d'intérêts**
194 Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts en relation avec
195 cet article.
- 196 *Sources de financement* : le travail de recherche sur l'atteinte entérique
197 dans la maladie de Parkinson à l'Inserm U913 est financé par la
198 Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research, la DRC du CHU
199 de Nantes, l'association ARAMISE, l'association PSP France, la Fédération
200 française des groupements de parkinsoniens (FFGP) et les
201 parkinsoniens de Vendée.
- 202 **RÉFÉRENCES**
- 203 Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, Greene JG.
204 Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric
205 ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol* 2012;124(5):665–80.
- 206 Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White III CL, et al. Multi-
207 organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology
208 in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*
209 2009;119(6):689–702.
- 210 Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and
211 neurologic implications. *Neurology* 2007;69(20):1953–7.
- 212 Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein
213 immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses
214 in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology.
215 *Neurosci Lett* 2006;396(1):67–72.
- 216 Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E.
217 Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.
218 *Neurobiol Aging* 2003;24(2):197–211.
- 219 Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist
220 M, De Giorgio R. Parkinson disease: the enteric nervous system
221 spills its guts. *Neurology* 2011;77(19):1761–7.
- 222 Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, et al.
223 Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2012.
224 Q2 Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM,
225 et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refin-
226 ing the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 2009;8(12):1150–7.
- 227 Folgoas E, Lebouvier T, Leclair-Visonneau L, Cersosimo M-G, Bar-
228 thelaix A, Derkinderen P, et al. Diagnostic value of minor salivary
229 glands biopsy for the detection of Lewy pathology. *Neurosci Lett*
230 2013.
- 231 Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia
232 in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*
233 2012.
- 234 Hirsch EC, Vyas S, Hunöt S. Neuroinflammation in Parkinson's
235 disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(Suppl. 1):S210–2.
- 236 Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein
237 pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 2008.
238 Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, Cote LJ. Parkinson's
239 disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy
240 bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 1987;37(7):1253–5.
- 241 Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes
242 S, Neunlist M, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study
243 the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol*
244 *Motil* 2010a;22(1):e11–4.
- 245 Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A,
246 Nguyen JM, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of
247 Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*
248 2010b;5(9):e12728.
- 249 Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M, Derkin-
250 deren P. Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for
251 Parkinson's disease? *Front Psychiatry* 2010c;1:128.
- 252 Marek K, Jennings D, Tamagnan G, Seibyl J. Biomarkers for Parkin-
253 son's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease
254 onset and progression. *Ann Neurol* 2008;64(Suppl. 2):S111–21.
- 255 Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, Haga R, Nishijima H, Suzuki C, et al.
256 Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's
257 disease. *Neurosci Lett* 2009;469(3):357–9.
- 258 Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P. Lewy
259 pathology in gastric and duodenal biopsies in Parkinson's Disease.
260 *Mov Disord* 2012a;27(6):708.
- 261 Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Rouaud T, Flamant M, Toulgoat F,
262 et al. Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in
263 multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 2012b;18
264 (7):893–5.
- 265 Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy
266 bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity
267 to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1984;87(4):848–56.
- 268 Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neu-
269 rogastroenterol Motil* 2004;16(Suppl. 1):55–9.
- 270 Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkin-
271 son's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and
272 Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988;76(3):217–21.
- 273
274

Article 4 : Les cellules gliales entériques : nouveaux acteurs dans la maladie de Parkinson ?

Clairembault T., Leclair-Visonneau L., Neunlist M., Derkinderen P. (2014) Enteric Glial Cells : New players in Parkinson's disease ? *Mov Disord.* doi: 10.1002/mds.25979 (Cover page of Movement Disorders Volume 30, Issue 4, pages 494–498, April 2015)

Enteric Glial Cells: New Players in Parkinson's Disease?

Thomas Clairembault, BSc,^{1,2,3} Laurène Leclair-Visonneau, MD,^{1,2,4} Michel Neunlist, PhD,^{1,2,3} and Pascal Derkinderen, MD, PhD^{1,2,4*}

¹Inserm, U913, Nantes, F-44093, France

²University Nantes, Nantes, F-44093, France

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

⁴Inserm, CIC-04, Nantes, F-44093, France

ABSTRACT: Lewy pathology has been described in neurons of the enteric nervous system in nearly all Parkinson's disease (PD) patients at autopsy. The enteric nervous system not only contains a variety of functionally distinct enteric neurons but also harbors a prominent component of glial cells, the so-called enteric glial cells, which, like astrocytes of the central nervous system, contribute to support, protect, and maintain the neural network. A growing body of evidence supports a role for enteric glial cells in the pathophysiology of gastrointestinal disorders such as

inflammatory bowel disease and chronic constipation. We have recently shown that enteric glial cell dysfunction occurs in PD. In the present review, we discuss the possible implications of enteric glia in PD-related gut dysfunction as well as in disease initiation and development. © 2014 International Parkinson and Movement Disorder Society

Key Words: Parkinson's disease; enteric nervous system; enteric glial cells; GFAP

Over the last 15 years, that Parkinson's disease (PD) is a gut disorder has become evident.¹ Gastrointestinal symptoms occur in almost every PD patient at some point and are among the most debilitating non-motor features of the disease.² These clinical data have been supported by several pathological studies demonstrating the presence of Lewy bodies and neurites (together referred to as Lewy pathology) in the enteric nervous system. Since the first demonstration of Lewy bodies in the enteric nervous system in 1984,³ Lewy pathology has been confirmed in the enteric neurons in nearly every case examined pathologically.^{4,5}

The enteric nervous system also contains a population of glial cells, the so-called enteric glial cells, which are likely to represent the digestive counterpart of brain astrocytes.⁶ Several recent studies have

indicated that the enteric glial cells participate in the regulation of gastrointestinal functions and that they may be critically involved in the pathophysiology of gastrointestinal disorders such as inflammatory bowel disease and chronic constipation.^{6,7} We have recently shown that biochemical changes suggestive of glial dysregulation occurs in enteric glial cells in PD.^{8,9} This led us to propose that the enteric glial cells might be involved in PD-related gastrointestinal dysfunction as well as in disease initiation and development.

Enteric Glial Cells, the Gut Astrocytes

Dogiel was the first to describe the presence of glial cells within the enteric nervous system at the end of the nineteenth century.⁶ Nevertheless, for more than 70 years, enteric glia were largely ignored and frequently defined as Schwann cells. In his detailed anatomical description of the guinea-pig myenteric plexus, Gabella noted that enteric glial cells, such as astrocytes, carry extensive branchings and irregular processes that mingle with neuronal cell bodies and the axon bundles.¹⁰ A turning point came in the early 1980s when Jessen and Mirsky demonstrated that enteric glial cells were immunoreactive for the two

*Correspondence to: Dr. Derkinderen, Inserm U913, 1 place Gaston Veil, 44000 Nantes, France. E-mail: derkinderen@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report. Author roles may be found in the online version of this article.

Received: 10 June 2014; Revised: 14 July 2014; Accepted: 17 July 2014

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.25979

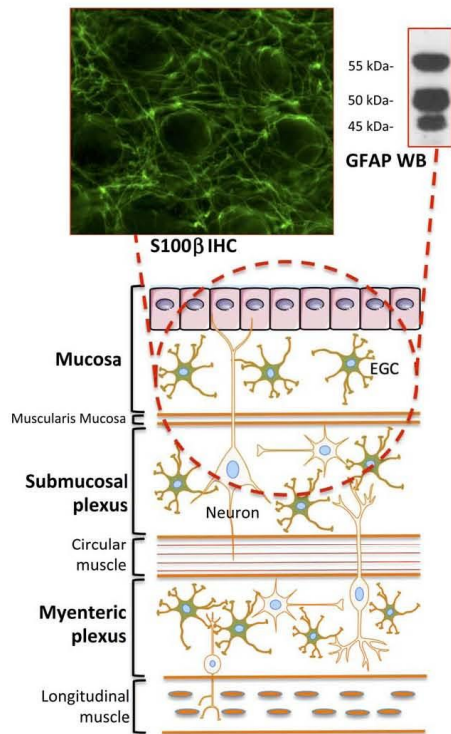


FIG. 1. Populations of enteric glial cells within the gut wall. A subpopulation of enteric glial cells is located directly underneath the epithelial cells and is involved in the regulation of intestinal epithelial barrier function. Enteric glial cells of the submucosal and myenteric plexus are mingled with neurons and are involved in the regulation of enteric neurotransmission. Enteric glial cells lying under the mucosa and in the submucosal plexus are readily analyzable using routine gastrointestinal biopsies (dashed line). Following microdissection of the biopsy, the glial network can be analyzed by immunohistochemistry (S100 β immunostaining). The whole biopsy also can be processed by Western blot for the analysis of the expression levels of glial markers, for instance, GFAP. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

canonical astrocyte markers, namely glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100-beta (Fig. 1).¹¹ More recent studies showed that the enteric glial cells and astrocytes are also similar at the functional levels, as they share electrophysiological and neuroprotective properties. Likewise, their central nervous system counterparts, enteric glial cells, possess a number of voltage-gated ion channels¹² and express neurotransmitter receptors such as purinergic, adrenergic, glutamate metabotropic receptors and are therefore capable of modulating synaptic transmission.^{13,14} Reduced glutathione and prostaglandins have been identified as factors secreted by the enteric glial cells protecting neurons from dopamine-induced oxidative stress.¹⁵

The glial population of the gut is unlikely to be homogenous, and unique populations of enteric glial cells may reside at multiple levels through the gut wall, the unique microenvironments of the gastrointestinal tract defining the phenotype of these cells (Fig. 1).⁶ Thus, enteric glial cells that lie in the mucosa directly underneath the epithelial cells influence epithelial cells and intestinal epithelial barrier function, whereas enteric glial cells of the submucosal or myenteric plexus embed neurons and are involved in the regulation of neurotransmission (Fig. 1).⁶ By contrast to the central nervous system astrocytes, the enteric glial cells are readily accessible and analyzable through routine gastrointestinal biopsies. We have shown that the microdissection of a routine colonic biopsy enables an immunohistochemical assessment of the glial network located either in the mucosa or in the submucosal plexus (Fig. 1).¹⁶ Biopsies also can be processed by polymerase chain reaction and Western blot, which can be used to measure quantitative differences in glial markers (Fig. 1).^{8,9,16}

Enteric Glial Cells in Gastrointestinal Physiology and Pathology

The intestinal epithelium forms a regulated barrier between the blood circulation and the contents of the intestinal lumen, preventing the passage of noxious contents while allowing the absorption and secretion of nutrients.¹⁷ Increasing evidence suggests that factors secreted by the enteric glial cells that are located directly underneath the intestinal epithelial cells (Fig. 1) are involved in the differentiation of epithelial cells and, as such, regulate gut barrier function.¹⁸

Increased expression of glial markers and especially of GFAP is a hallmark of reactive astrocytes in the central nervous system.¹⁹ Changes in the expression levels of the glial markers GFAP and S100-beta have been observed in various gastrointestinal disorders associated with barrier dysfunctions, including inflammatory bowel disorders. Both GFAP and S100-beta are up-regulated in the colons of patients with ulcerative colitis, whereas their expression levels are either unchanged or inconsistently increased in Crohn's disease.²⁰ This strongly suggests that the pattern of enteric glial dysregulation is different depending on the underlying pathological process and that ulcerative colitis might therefore represent a prototypical disorder for reactive enteric gliosis. Whether the reactive gliosis observed in inflammatory bowel disease is only a bystander effect or whether it participates actively in the inflammatory process remains to be elucidated. Slow-transit constipation, which defines patients with markedly delayed gut transit refractory to usual therapeutics, is another gastrointestinal pathology in which a role for the enteric glial cells has been suggested.

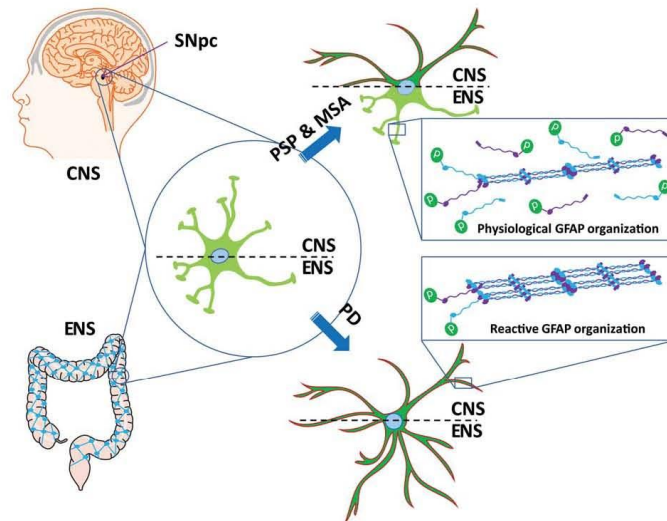


FIG. 2. Changes in enteric GFAP phosphorylation in PD. Astrocytic reactions characterized by morphological or biochemical changes of astrocytes have been described in the central nervous system (CNS) in PD, progressive supranuclear palsy (PSP), and multiple system atrophy (MSA) (rimmed cells). In the enteric nervous system (ENS), enteric glial cells exhibit major biochemical changes in PD (rimmed cells) but not in PSP and MSA (unrimmed cells). The biochemical changes observed in enteric glial cells in PD are exemplified by the phosphorylation status of GFAP. In physiological condition as well as in PSP and MSA, phosphorylation disassembles enteric GFAP filaments shifting the equilibrium to the soluble form of the protein and protecting it from proteolytic degradation (physiological GFAP organization). In PD, enteric GFAP is hypophosphorylated and therefore has a greater potential to assemble and a greater sensitivity to proteolytic cleavage. We suggest that these changes in phosphorylation regulate the structural plasticity of glial filaments and eventually functions of enteric glial cells. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Bassotti et al.²¹ investigated 26 patients with severe slow transit constipation who required colectomy and found that the density of enteric glial cells, as labeled by S100-beta was decreased when compared with control subjects.²¹ This led to the proposal that chronic constipation is an enteric neuro-gliopathy that might be explained by a defective neurotransmission induced by the loss of enteric glial cells.²¹

Enteric Glial Cells Dysregulation in PD

The emerging critical role of enteric glial cells in gastrointestinal function prompted us to investigate whether enteric Lewy pathology in PD was associated with enteric glial cells dysfunction. A first critical step was to study whether changes in the expression levels of the three commonly used enteric glial markers, GFAP, S100-beta, and Sox-10, were present in PD. Using quantitative polymerase chain reaction in colonic biopsies, we showed that the expression levels of GFAP and Sox-10, but not S100-beta, were increased in the gastrointestinal tract of PD patients.⁸ The GFAP and Sox-10 levels strongly correlated with the amount of several pro-inflammatory cytokines,

including interleukin-6,⁸ which is released after enteric glial cells activation.²² These first observations strongly supported the idea that glial reaction occurs in the gastrointestinal tract during PD. We were nevertheless struck by the heterogeneity of GFAP levels between PD patients, some displaying a level comparable to controls, whereas others had a more than a threefold increase in GFAP messenger RNA. Levels of glial markers were negatively related to disease duration, suggesting that enteric glial reaction is high at disease onset and decreases over time.⁸ Enteric glial reaction may be high at disease onset when the activated cells release their cytokines, then decreasing while maintaining ongoing disease activity as already shown in the brain for microglial activation.²³

Glial fibrillary acidic protein is a phosphoprotein and phosphorylation of serine, and threonine residues from its amino-terminus are involved in the regulation of the protein self-assembly (Fig. 2).²⁴ Because the stability of the cytoskeleton is essential for normal astrocyte function, GFAP phosphorylation may be critically involved in central nervous system disorders. Changes in GFAP phosphorylation and especially at serine 13 residue has been reported in the brain of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia^{25,26} as well as in a pig model of brain hypoxia.²⁷ We

therefore investigated whether the GFAP phosphorylation status was affected in the gastrointestinal tract during PD. By using two different antibodies specific for GFAP phosphorylated at serine 13, we showed that GFAP was hypophosphorylated at this residue in colon biopsy specimens from PD patients when compared with healthy controls (Fig. 2).⁹

Taken together, the biochemical changes in GFAP observed in the colon of PD patients are highly suggestive of reactive gliosis.¹⁹ Interestingly, these glial changes were specific to PD because no changes in GFAP expression or phosphorylation were observed when colon biopsy samples from progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy patients were analyzed.⁹ By demonstrating the occurrence of glial reaction in the gastrointestinal tract of PD patients but not in related disorders, our results are consistent with the idea that PD is not limited to the central nervous system but is in fact a widespread neuronal disorder affecting peripheral autonomic networks and in particular the enteric nervous system. Moreover, they also suggest that the pathology in progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy is limited to the central nervous system and does not affect the peripheral nervous systems.^{28,29}

Possible Roles of Enteric Glial Cells Dysregulation in PD

In light of these findings, what are the likely pathological outcomes of enteric glial dysregulation observed in PD? First, these enteric glial changes might be involved in the gastrointestinal symptoms often seen in PD.² Results from autopsy study have indicated no overt neuron loss or changes in the neurochemical phenotype in the gut in PD, suggesting that neuropathology in the enteric nervous system is unlikely to be a causative factor in PD-related gastrointestinal dysfunction.^{30,31} One might therefore postulate that the biochemical changes of enteric glial cells in PD might induce glial dysfunction, which in turn would lead to synaptic dysfunction and altered gastrointestinal motility as already suggested for chronic constipation.²¹ Second, the occurrence of enteric glial cells dysfunction in PD provides an argument to support Braak's hypothesis. Braak has proposed that PD may be triggered by a hitherto unknown neurotropic agent that breaches the intestinal epithelial barrier to initiate α -synuclein (α -Syn) aggregation in the terminal axons of the submucosal plexus.³² Thereafter, according to the hypothesis, α -Syn pathology would propagate in a prion-like manner to the central nervous system via the vagal preganglionic innervation of the gut.³² In such a scenario, the enteric glial reaction observed in PD may play a key role by modulating intestinal permeability as greater gut permeability has

been observed in PD patients^{33,34} and in experimental parkinsonism.³⁵ Equally intriguing is the possible role of enteric extracellular α -Syn,³⁶ which might promote local glial reaction, as already demonstrated in the central nervous system.³⁷ The enteric glial reaction would in turn induce local pro-inflammatory cytokines secretion and inflammation, thereby facilitating the spreading of PD pathological process.³⁸

Conclusion and Perspective

A pressing need exists for biomarkers not only to differentiate PD from related disorders but also to assess disease severity and progression. Despite technological advances in the field of neuroimaging, no fully validated biomarker for PD is available yet. The observations demonstrating that PD pathology was not limited to the central nervous system but also involved peripheral neuronal networks such as the enteric nervous system have provided new opportunities for the development of novel biomarkers of the disease. To date, search for enteric nervous system biomarkers in PD has focused on the identification of enteric nerve α -synuclein deposits.³⁹ The identification of enteric glial cells dysfunction in PD opens the way for the discovery of enteric biomarkers, which can go beyond the mere assessment of Lewy pathology.³⁹ Providing that, similarly to astrocytes,⁴⁰ the enteric glial cells are involved in the earliest disease changes, they might be considered as a source of biomarkers for prodromal PD. ■

Acknowledgment: We would like to acknowledge the general support for Parkinson's disease research provided by the Michael J Fox Foundation for Parkinson's Research, France Parkinson and CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens)

References

1. Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, et al. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology* 2011;77:1761-1767.
2. Edwards LL, Quigley EM, Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* 1992;42:726-732.
3. Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia: similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1984;87:848-856.
4. Beach TG, Adler CH, Sue LI, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2009;119:689-702.
5. Gelpi E, Navarro-Orano J, Tolosa E, et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 2014; doi: 10.1002/mds.25776.
6. Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:625-632.
7. Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, et al. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:90-100.
8. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2013;50:42-48.
9. Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014; doi: 10.1111/jnc.12742.

10. Gabella G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat* 1972;111:69-97.
11. Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 1980;286:736-737.
12. Hanani M, Francke M, Härtig W, et al. Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G644-G651.
13. Nasser Y, Ho W, Sharkey KA. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J Comp Neurol* 2006;495:529-553.
14. Nasser Y, Keenan CM, Ma AC, et al. Expression of a functional metabotropic glutamate receptor 5 on enteric glia is altered in states of inflammation. *Glia* 2007;55:859-872.
15. Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, et al. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* 2010;24:1082-1094.
16. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:e11-e14.
17. Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:416-422.
18. Van Landeghem I, Chevalier J, Mahe MM, et al. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G976-G987.
19. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014;81:229-248.
20. Boyen von GB, Schulte N, Pfluger C, et al. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* 2011;11:3.
21. Bassotti G, Villanacci V, Maurer CA, et al. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* 2006;55:41-46.
22. Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1163-G1171.
23. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, et al. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006;21:404-412.
24. Takemura M, Gomi H, Colucci-Guyon E, Itohara S. Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. *J Neurosci* 2002;22:6972-6979.
25. Herskowitz JH, Seyfried NT, Duong DM, et al. Phosphoproteomic analysis reveals site-specific changes in GFAP and NDRG2 phosphorylation in frontotemporal lobar degeneration. *J Proteome Res* 2010;9:6368-6379.
26. Korolainen MA, Auriola S, Nyman TA, et al. Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis* 2005;20:858-870.
27. Sullivan SM, Sullivan RKP, Miller SM, et al. Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res* 2012;37:2364-2378.
28. Poulet H, Lebouvier T, Coron E, et al. Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Rel Disord* 2012;18:893-895.
29. Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, et al. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta neuropathologica* 2010;120:1-12.
30. Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, et al. Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol* 2012;124:665-680.
31. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 2010;5:e12728.
32. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;396:67-72.
33. Salat-Foix D, Tran K, Ranawaya R, et al. Increased intestinal permeability and Parkinson disease patients: chicken or egg? *Can J Neurol Sci* 2012;39:185-188.
34. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* 2011;6:e28032.
35. Kelly IP, Carvey PM, Keshavarzian A, et al. Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; doi: 10.1002/mds.25736.
36. Paillusson S, Clairembault T, Biraud M, et al. Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J Neurochem* 2013; 125:512-517.
37. Lee H-J, Suk J-E, Patrick C, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem* 2010;285:9262-9272.
38. Lema Tomé CM, Tyson T, Rey NL, et al. Inflammation and alpha-synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link? *Mol Neurobiol* 2013;47:561-574.
39. Sánchez-Ferro A, Rábano A, MD, Catalán MJ, et al. In vivo gastric detection of alpha-synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014; in press.
40. Visanji NP, Marras C, Hazrati L-N, et al. Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric alpha-synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov Disord* 2014;29:444-450.

Participation à des travaux tiers

Article 5 : Sécrétion activité-dépendante de l'alpha-synucléine par les neurones entériques.

Paillusson S., Clairembault T., Biraud M., Neunlist M., Derkinderen P. (2012) Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J Neurochem.* doi: 10.1111/jnc.12131

SHORT

COMMUNICATION

Activity-dependent secretion of alpha-synuclein
by enteric neuronsSébastien Paillusson,*†‡ Thomas Clairembault,*†‡ Mandy Biraud,*‡
Michel Neunlist*†‡ and Pascal Derkinderen*†‡§

*Inserm, U913, Nantes, France

†University Nantes, Nantes, France

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

§Department of Neurology, CHU Nantes, France

Abstract

There is growing evidence supporting a role of extracellular alpha-synuclein in the spreading of Parkinson's disease (PD) pathology. Recent pathological studies have raised the possibility that the enteric nervous system (ENS) is one of the initial sites of alpha-synuclein pathology in PD. We therefore undertook this survey to determine whether alpha-synuclein can be secreted by enteric neurons. Alpha-synuclein secretion was assessed by immunoblot analysis of the culture medium from primary culture of ENS. We show

that alpha-synuclein is physiologically secreted by enteric neurons via a conventional, endoplasmic reticulum/Golgi-dependent exocytosis, in a neuronal activity-regulated manner. Our study is the first to evidence that enteric neurons are capable of secreting alpha-synuclein, thereby providing new insights into the role of the ENS in the pathophysiology of PD.

Keywords: alpha-synuclein, enteric nervous system, enteric neurons, neuronal activity, Parkinson's disease, secretion. *J. Neurochem.* (2013) **125**, 512–517.

Read the **Editorial Highlight** for this article on page 487.

Alpha-synuclein, a 140-amino acid neuronal protein, attracted great interest since 1997 after a mutation in its gene was identified in autosomal dominant Parkinson's disease (PD) (Polymeropoulos *et al.* 1997), and its aggregates were found to be the primary components of Lewy bodies, the pathological hallmarks of PD (Spillantini *et al.* 1997). Although initially considered as an intracellular protein, recent reports have shown that alpha-synuclein also exerts its effects extracellularly (Borghi *et al.* 2000; El-Agnaf *et al.* 2003). Alpha-synuclein can be secreted into the culture medium of differentiated human neuroblastoma cells and primary cortical neurons (Lee *et al.* 2005) and detected in human cerebrospinal fluid and plasma (El-Agnaf *et al.* 2003). Recent reports have shown that alpha-synuclein can be directly transferred from nerve cells that over-express the protein to neighboring cells both in tissue culture and in transgenic animals (Desplats *et al.* 2009; Hansen *et al.* 2011). This suggests that alpha-synuclein has the potential to spread from one nerve cell to another, thereby contributing to the diffusion of neuropathology from one brain region to the next (Angot *et al.* 2010).

The distribution of alpha-synuclein pathology in PD is much greater than formerly appreciated. Lewy bodies

distribution extend well beyond the *substantia nigra* and involves peripheral nervous networks, especially the enteric nervous system (ENS) (Beach *et al.* 2009). Braak and colleagues have determined that the appearance of alpha-synuclein aggregates occurs in the ENS at the earliest stage of the disease, leading to the assumption that PD pathology may in fact begin in the gastrointestinal tract, further spreading to the central nervous system (CNS) via the vagal pre-ganglionic innervation of the gut (Braak *et al.* 2006). Alpha-synuclein expression in the ENS is restricted to a subset of enteric neurons that are synaptically linked with alpha-synuclein-positive vagal neurons, thus providing a candidate alpha-synuclein-expressing pathway for the retrograde transport of PD pathology (Phillips *et al.* 2008). In this context, it is crucial to determine whether enteric neurons are

Received July 10, 2012; revised manuscript received December 16, 2012; accepted December 17, 2012.

Address correspondence and reprint requests to Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1, place Alexis Ricordeau 44093 Nantes Cedex 1, France. E-mails: derkinderenp@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Abbreviations used: BFA, brefeldin A; BSA, bovine serum albumin; CNS, central nervous system; ENS, enteric nervous system; PD, Parkinson's disease.

capable of secreting alpha-synuclein. The aim of this survey was therefore to study the secretion of alpha-synuclein in primary culture of ENS.

Material and methods

Reagents and antibodies

Forskolin, veratridine, brefeldin A (BFA) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Recombinant alpha-synuclein was obtained from Millipore (Molsheim, France). The following commercially available antibodies were used for western blotting: rabbit polyclonal anti-alpha-synuclein C-20 (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), mouse monoclonal anti-alpha-synuclein Syn-1 (1 : 500; BD Bioscience, Le Pont-De-Claix, France), mouse monoclonal anti-ubiquitin P4D1 (1 : 1000; Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), rabbit polyclonal anti-bovine serum albumin (BSA) (1 : 1000; Millipore), and mouse monoclonal anti-Protein Gene Product (PGP) 9.5 (1 : 1000; Ultraclone limited, Isle of Wight, UK). Mouse monoclonal anti-alpha-synuclein Syn-1 and rabbit polyclonal anti-alpha-synuclein C-20 were used for ELISA.

Primary cultures of ENS

Primary cultures of ENS were performed as previously described using small intestine of E15 rat embryos (Paillussou *et al.* 2010).

Culture medium and cell lysates western blots

The culture medium (CM) was collected and centrifuged at 4000 g for 10 min at 4°C to remove cell debris. The CM was further concentrated at 1800 g for 28 min using 9-kDa-cutoff concentrators (Pierce, Brébieres, France). Harvesting of primary cultures of ENS as well as western blotting analysis and quantification were performed as described previously (Paillussou *et al.* 2010). PGP9.5 and BSA were used as protein loading controls for cell lysates and CM samples, respectively.

Alpha-synuclein ELISA assay

For ELISA, immuno 96 MicroWell™ Solid Plates (Thermo Scientific, Brébieres, France) were coated for 24 h at 20°C with 0.5 µg/mL of rabbit polyclonal anti-alpha-synuclein antibody C-20 in 100 mM NaHCO₃ at pH 9.3. Plates were washed three times in wash buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.04% v/v Tween-20) and blocked for 30 min with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% (w/v) BSA. Recombinant alpha-synuclein diluted in PBS (50 mM potassium phosphate; 150 mM NaCl; pH 7.2) containing 1% (w/v) BSA was used as standard. Concentrated CM or standards were added and plates were incubated at 37°C for 2.5 h. After washing three times with wash buffer, 50 µL of mouse monoclonal anti-alpha-synuclein Syn-1 (1 : 2500 in PBS with 1% w/v BSA) was added to each well and incubated for 1 h at 20°C. Then, wells were washed three times and filled with 50 µL of biotinylated goat anti-mouse antibody (1 : 2500; Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France) for 1 h followed by a washing step procedure. Finally, horseradish peroxidase-coupled streptavidin (1 : 1000; Thermo Scientific) was added for 30 min and after a three-times washing procedure, TMB substrate (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) was added to each well for 15 min at 20°C. The chemiluminescence was integrated for 1 s.

Cell death assays

Neuronal cell death was assessed by quantifying the release of neuron-specific enolase (NSE) into culture medium as described previously (Abdo *et al.* 2010).

Statistical analysis

All data are given as the mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons of means between groups were performed by Student's *t*-test for unpaired data or by analysis of variance followed by Dunnett's test. When data were not normally distributed, a Mann-Whitney test was performed. Differences were considered statistically significant if *p* < 0.05.

Results

Alpha-synuclein is physiologically secreted by enteric neurons

Primary culture of ENS contains smooth muscle, enteric glial cells, and neurons. We have previously shown that only neurons express alpha-synuclein in this primary culture model (Paillussou *et al.* 2010). To determine whether enteric neurons secrete alpha-synuclein, culture medium (CM) was concentrated and immunoblotted with C-20 antibodies. Alpha-synuclein was detected in the CM as early as 3 h and accumulated over time (Fig. 1a and b), while the expression levels of intracellular alpha-synuclein remained constant (Fig. 1a). The identity of the band detected by alpha-synuclein antibodies was confirmed by comigration with recombinant alpha-synuclein (data not shown). The accumulation of alpha-synuclein in the CM was not explained by the membrane leakage caused by cell death as (i) the amount of NSE in the CM remained relatively stable throughout the 48-h period (8.7 ± 2.3 ng/mL at 6 h and 9.5 ± 1.6 ng/mL at 48 h; *n* = 5 *p* > 0.05), (ii) the cytosolic protein ubiquitin was not detected in the CM and did not accumulate over time (Fig. 1a). We quantified the levels of secreted alpha-synuclein in the CM after 48 h by ELISA. The concentration of alpha-synuclein was estimated to be 12.8 ± 3.7 pg/mL. Altogether, these results show that alpha-synuclein is physiologically secreted by enteric neurons.

Studies performed in SH-SY5Y cells over-expressing alpha-synuclein suggested that it is constitutively secreted via an unconventional secretory pathway because brefeldin A (BFA), a classical inhibitor of the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi-dependent secretion pathway had no effect on alpha-synuclein secretion (Lee *et al.* 2005; Emmanouilidou *et al.* 2010). We have therefore assessed the effects of BFA in primary culture of ENS. Treatment of primary culture of ENS with 1 µg/mL BFA for 6 h significantly reduced alpha-synuclein release as compared with controls (Fig. 2a and b). By contrast, when the same treatment was applied to culture of primary cortical neurons, no changes in the levels of extracellular alpha-synuclein were observed (data not shown). Cell viability in primary culture of ENS as assessed by NSE release in the CM was not compromised following

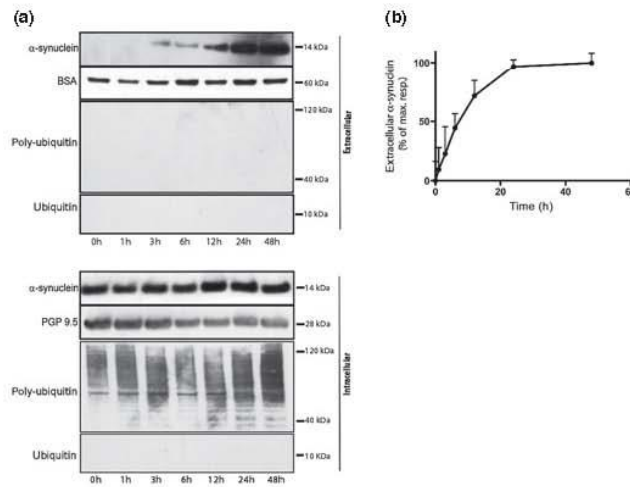


Fig. 1 Secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. (a) After 10 days in culture, the medium of primary culture of enteric nervous system (ENS) was totally replaced for a period ranging from one to 48 hours. Cells were harvested, homogenized, and 35 μ g of protein per sample was subjected to immunoblot analysis using Syn-1 and anti-ubiquitin antibodies (ubiquitin and poly-ubiquitin). In parallel, CM were concentrated and subjected to immunoblot analysis using C-20 antibodies and anti-ubiquitin antibodies. After stripping, membranes

were re-probed with the appropriate loading control [PGP 9.5 or bovine serum albumin (BSA)] to ensure equal loading of intracellular or extracellular proteins, respectively. (b) For quantification, the optical densities of extracellular alpha-synuclein-immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of BSA-immunoreactive bands in the same samples, and expressed as percentages of maximum response. Data correspond to means \pm SEM of four experiments per condition.

a 6-h treatment with BFA (8.9 ± 1.1 ng/mL for controls, 8.5 ± 3.7 ng/mL for BFA-treated cells, $n = 3$, $p > 0.05$). This suggests that alpha-synuclein secretion in enteric neurons occurs through a secretory mechanism likely to be dependent on ER/Golgi-related vesicular transport.

Another remarkable result obtained in SH-SY5Y cells was that the amount of released alpha-synuclein in the CM correlated with its intracellular expression levels (Lee *et al.* 2005; Emmanouilidou *et al.* 2010). To address this issue we used forskolin, as we have previously demonstrated that such a treatment was capable of increasing intracellular alpha-synuclein expression in enteric primary culture without any deleterious effect on cell survival (Paillusson *et al.* 2010). We show in this survey, that the 2.7-fold increase in intracellular alpha-synuclein expression levels evoked by 20 μ M forskolin for 48 h was not associated with changes in the amount of extracellular alpha-synuclein (Fig. 2c and d). These results are in sharp contrast with that obtained in neuronal cell lines (Lee *et al.* 2005; Emmanouilidou *et al.* 2010) and suggest that the release of alpha-synuclein in the CM by enteric neurons is, at least partially, regulated.

Alpha-synuclein secretion is regulated by neuronal activity
Given that alpha-synuclein seems to be secreted through a regulated mechanism dependent on classical vesicular trans-

port, we tested whether neuronal activity regulates its secretion. A 48-h treatment of primary culture of ENS with the sodium channel activator veratridine at 30 μ M significantly increased the release of alpha-synuclein in the CM as compared with controls (Fig. 3a and b). This was associated with a statistically significant drop in the level of intracellular alpha-synuclein (Fig. 3a and b). Treatment of primary culture of ENS with the sodium channel blocker tetrodotoxin at 1 μ M for 48 h induced a significant increase in intracellular alpha-synuclein expression as compared with controls (Fig. 3a and b). In parallel, a decrease in alpha-synuclein level in the CM was observed, but it did not reach significance. Under veratridine and tetrodotoxin treatments, cell viability as assessed by the release of NSE, was not compromised (11.1 ± 2.4 ng/mL for controls, 14.5 ± 1 ng/mL for veratridine-treated cells, $n = 3$, $p = 1$; 20.6 ± 17 ng/mL for controls, 35.2 ± 10.5 ng/mL for tetrodotoxin-treated cells, $n = 3$, $p = 0.4$).

To further investigate the role of neuronal activity, we studied whether intracellularly accumulated alpha-synuclein can be secreted. To this end, primary culture of ENS were treated with 20 μ M forskolin then depolarized with veratridine. Treatment with veratridine induced the secretion of alpha-synuclein that accumulated following forskolin treatment (Fig. 3c and d).

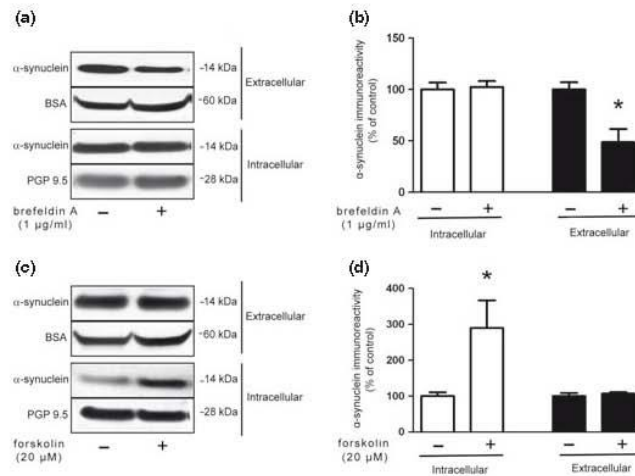


Fig. 2 Effects of brefeldin A (BFA) and forskolin on alpha-synuclein secretion. (a) After 10 days in culture, the medium of primary culture of enteric nervous system (ENS) was totally replaced and primary cultures were treated with vehicle (control) or with 1 µg/mL of BFA for 6 h. Immunoblots were performed as described in Fig. 1a. (b) Quantification of the results for alpha-synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 1b. White bars represent experiments performed with cell lysates (intracellular), black bars represent experiments performed with CM (extracellular). Statistical analysis was done with a Student's *t*-test followed by Mann Whitney *post-hoc* test (treated vs. control **p* < 0.05). Data correspond to means ± SEM of at least three experiments per condition. (c) After

10 days in culture, the medium of primary culture of ENS was totally replaced and primary cultures were treated either with vehicle (control) or 20 µM of forskolin for 48 h. Immunoblots were performed as described in Fig. 1a. (d) Quantification of the results for alpha-synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 1b. White bars represent experiments performed with cell lysates (intracellular), black bars represent experiments performed with CM (extracellular). Statistical analysis was done with an ANOVA test followed by a Dunnett *post-hoc* test (treated vs. control **p* < 0.05). Data correspond to means ± SEM of at least three experiments per condition.

Taken as a whole, these results demonstrate that alpha-synuclein secretion in enteric neurons is regulated by neuronal activity.

Discussion

We have shown in this survey that alpha-synuclein is physiologically secreted by enteric neurons and that its secretion is regulated by neuronal activity.

Because of the lack of an ER signaling peptide from its sequence, alpha-synuclein was considered to be an exclusive intracellular protein. Using SH-SY5Y cells over-expressing alpha-synuclein, two different groups have convincingly shown that alpha-synuclein can be secreted in the extracellular space, thereby affecting neighboring neurons (Lee *et al.* 2005; Emmanouilidou *et al.* 2010). We show in this report that alpha-synuclein can also be secreted from peripheral and more particularly from enteric neurons. The levels of secreted alpha-synuclein in primary culture of ENS were similar to those described in biological fluids and in tissue (Emmanouilidou *et al.* 2011). In accordance with the previous

reports, secreted alpha-synuclein in primary culture of ENS accumulated over time and was not attributable to cell death as measured by the release of NSE in the extracellular space. This suggests that at least a portion of alpha-synuclein from enteric neurons is secreted in a constitutive manner or following spontaneous enteric neuronal activity.

This led us to investigate the mechanisms of alpha-synuclein secretion by enteric neurons and especially the role of neuronal activity. It has been suggested previously that alpha-synuclein exocytosis is mediated by a non-classical, BFA-independent, secretory mechanism (Lee *et al.* 2005; Emmanouilidou *et al.* 2010). In sharp contrast with these two previous reports, we show in this survey that treatment of primary culture of ENS with BFA resulted in a significant decrease in alpha-synuclein secretion, strongly suggesting that enteric alpha-synuclein follows a conventional secretory pathway. This is reinforced by our observations showing a tight regulation of alpha-synuclein release by neuronal activity, which is known to regulate conventional exocytosis. In support of this idea, a portion of pre-synaptic alpha-synuclein has been shown to be present within

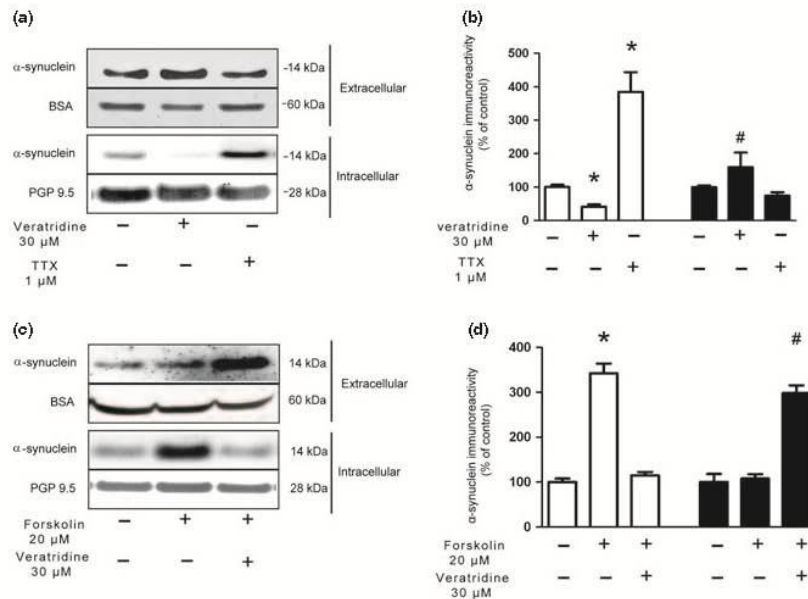


Fig. 3 Effects of neuronal activity on alpha-synuclein secretion. (a) After 10 days in culture, the medium of primary culture of enteric nervous system (ENS) was totally replaced and primary cultures were treated with vehicle, 30 μM of veratridine, or 1 μM TTX for 48 h. Immunoblots were performed as described in Fig. 1a. (b) quantification of the results for alpha-synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 1b. White bars represent experiments performed in cell lysates, black bars represent experiments performed in CM. Statistical analysis was done with an ANOVA test followed by a Dunnett *post-hoc* test (treated vs. control * $p < 0.05$; treated vs. control # $p < 0.05$). Data correspond to means \pm SEM of at least three experiments per condition. (c) After 10 days in culture, the medium

of primary culture of ENS was totally replaced and primary cultures were treated with vehicle (control) or with 20 μM of forskolin for 72 h, or with 20 μM of forskolin for 72 h followed by a 6-h treatment with 30 μM veratridine. Immunoblots were performed as described in Fig. 1a. (d) quantification of the results for alpha-synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 1b. White bars represent experiments performed in cell lysates, black bars represent experiments performed in CM. Statistical analysis was done with an ANOVA test followed by a Dunnett *post-hoc* test (treated vs. control * $p < 0.05$; treated vs. control # $p < 0.05$). Data correspond to means \pm SEM of at least three experiments per condition.

synaptic vesicles either in SH-SY5Y cells or in rat brain (Lee *et al.* 2005; Lee 2008), and neuronal activity controls the pre-synaptic accumulation of alpha-synuclein (Fortin *et al.* 2005). Our study is the first to directly address the regulation of alpha-synuclein secretion by depolarization. Although Lee and collaborators elegantly demonstrated that alpha-synuclein was localized within vesicle lumen, they did not mention the effects of depolarization, probably because alpha-synuclein secretion was BFA independent in their cell system (Lee *et al.* 2005). More recently, Emmanouilidou *et al.* showed that a portion alpha-synuclein is secreted via an exosomal calcium-dependent mechanism in SH-SY5Y cells (Emmanouilidou *et al.* 2010). Nevertheless, as stated in their discussion, it is not possible to rule out the possibility that alternative mechanisms for alpha-synuclein secretion, such as secretory vesicle-mediated exocytosis that is also calcium-

sensitive, may also operate. Altogether, our results and the available data on alpha-synuclein secretion show that alpha-synuclein secretion from neurons is likely to occur through several pathways, either following conventional or unconventional exocytosis.

Our findings may be relevant to the pathogenesis of PD. Although precise etiology of the disease remains unknown, it is suggested that, besides genetic factors or in combination with, environmental factors could be critically involved. Some recent evidences suggest that the pathological process of PD affects the ENS at a very early stage of the disease (Braak *et al.* 2006). Remarkably, the enteric neurons are directly in contact with the environment, leading to the postulate, the so-called Braak's hypothesis, that they could represent a route of entry for an hitherto unknown environmental factor to initiate the pathological process

further spreading to the CNS and more precisely to the dorsal motor nucleus of the vagus via the vagal pre-ganglionic innervation of the gut (Braak *et al.* 2002, 2006). If Braak's theory is true, two necessary conditions must be satisfied. First, an uninterrupted pathway that expresses alpha-synuclein throughout its trajectory should allow the retrograde transport of the pathological process from the gastrointestinal tract to the CNS. Second, enteric neurons should be able to secrete alpha-synuclein to transmit the pathological process from cell to cell as suggested for CNS neurons (Hansen *et al.* 2011). The first condition is fulfilled as Phillips and coworkers have elegantly shown that vagal efferent axons and terminals, which originate from the dorsal motor nucleus of the vagus, are positive for alpha-synuclein and that some of these pre-ganglionic efferent neurons synapse on alpha-synuclein-positive intrinsic neurons in the myenteric plexus of both the stomach and duodenum (Phillips *et al.* 2008). Regarding the second condition, our results allow us to consider that alpha-synuclein could behave in the ENS like in the CNS and thus transmit the pathology from neuron to neuron (Angot *et al.* 2010).

Acknowledgements

This work was supported by a grant from France Parkinson and CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens). Work in Michel Neunlist's lab is supported by Michael J Fox Foundation for Parkinson's Research, Fondation de France, France Parkinson, ADPLA (Association des Parkinsoniens de Loire Atlantique), FFPG (Fédération française des groupements parkinsoniens), Parkinsoniens de Vendée. SP is a recipient of a 'bourse MENRT'. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abdo H., Derkinderen P., Gomes P., Chevalier J., Aubert P., Masson D., Galmiche J. P., Vanden Berghe P., Neunlist M. and Lardoux B. (2010) Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* **24**, 1082–1094.
- Angot E., Steiner J. A., Hansen C., Li J. Y. and Brundin P. (2010) Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol.* **9**, 1128–1138.
- Beach T. G., Adler C. H., Sue L. I. *et al.* (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* **119**, 689–702.
- Borghetti R., Marchese R., Negro A., Marinelli L., Forloni G., Zaccaro D., Abbruzzese G. and Tabaton M. (2000) Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci. Lett.* **287**, 65–67.
- Braak H., Del Tredici K., Bratzke H., Hamm-Clement J., Sandmann-Keil D. and Rub U. (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J. Neurol.* **249** (Suppl 3), III/1–III/5.
- Braak H., de Vos R. A., Bohl J. and Del Tredici K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72.
- 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 alpha-synuclein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 13010–13015.
- El-Agnaf O. M., Salem S. A., Paleologou K. E. *et al.* (2003) Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* **17**, 1945–1947.
- Emmanouilidou E., Melachroinou K., Roumeliotis T., Garbis S. D., Ntzouni M., Margaritis L. H., Stefanis L. and Vekrellis K. (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal. *J. Neurosci.* **30**, 6838–6851.
- Emmanouilidou E., Elenis D., Pappasilekas T., Stranjalis G., Gerozissis K., Ioannou P. C. and Vekrellis K. (2011) Assessment of alpha-synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PLoS ONE* **6**, e22225.
- Fortin D. L., Nemani V. M., Voglmaier S. M., Anthony M. D., Ryan T. A. and Edwards R. H. (2005) Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *J. Neurosci.* **25**, 10913–10921.
- Hansen C., Angot E., Bergström A. L. *et al.* (2011) Alpha-synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultures human cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 715–725.
- Lee S. J. (2008) Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* **34**, 17–22.
- Lee H. J., Patel S. and Lee S. J. (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.* **25**, 6016–6024.
- Paillasson S., Tasselli M., Lebouvier T., Mahe M. M., Chevalier J., Biraud M., Cario-Toumaniantz C., Neunlist M. and Derkinderen P. (2010) alpha-Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J. Neurochem.* **115**, 694–706.
- 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.
- 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.
- 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.

Article 6 : Implication du système nerveux autonome périphérique dans un cas de parkinsonisme lié à la maladie de Gaucher.

Lebouvier T., Clairembault T., Devos D., Pallardy A., Coron E., Neunlist M., Derkinderen P. (2014) Peripheral autonomic nervous system involvement in Gaucher-related Parkinsonism. *J Parkinsons Dis.* doi: 10.3233/JPD-130333

Short Communication

Peripheral Autonomic Nervous System Involvement in Gaucher-Related Parkinsonism

Thibaud Lebouvier^{a,b,c,d}, Thomas Clairembault^{a,b,c,d}, David Devos^{a,b,c,d}, Amandine Pallardy^e, Emmanuel Coron^{a,b,c,f}, Michel Neunlist^{a,c,f} and Pascal Derkinderen^{a,b,c,d,*}

^aInserm, U913, Nantes, France

^bInserm, CIC-04, Nantes, France

^cUniversity Nantes, Nantes, France

^dCHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, France

^eNuclear Medicine Department, René Gauducheau Cancer Center, Boulevard Jacques Monod, Saint Herblain, France

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

Abstract. The pathological process affects the peripheral autonomic nervous system in the vast majority of sporadic PD patients. Recent reports have shown that patients with a familial form of the disease caused by mutation of the gene encoding LRRK2 and alpha-synuclein also display autonomic abnormalities, especially cardiac sympathetic denervation. In the present report, we have studied the involvement of the peripheral autonomic system in a patient with Gaucher disease-associated parkinsonism. Using colonic biopsies and quantitative 123I-MIBG scintigraphy respectively, we show that both Lewy pathology and cardiac denervation were present in this case of Gaucher-associated Parkinsonism. We discuss the consequence of these findings on the pathophysiology of the disease.

Keywords: Parkinson's disease, gaucher disease, enteric nervous system, alpha-synuclein, biopsies, MIBG scintigraphy

Mutations in the gene encoding the lysosomal enzyme glucocerebrosidase lead to Gaucher disease (GD), the most common autosomal recessive lysosomal storage disease. It has been now clearly demonstrated that a subset of patients with GD develop parkinsonism, some with idiopathic Parkinson's disease (PD) [1]. *Postmortem* brain tissue examination of patients with GD-associated parkinsonism have

consistently shown classic PD pathology, namely neuronal loss in the *substantia nigra* along with the presence of Lewy pathology in the remaining surviving neurons [2]. In sporadic PD, pathology is nevertheless not limited to the central nervous system. Recent evidence from comprehensive autopsy surveys showed that the peripheral autonomic system was affected by Lewy pathology in the vast majority of PD cases [3]. The lesions of these autonomic networks predominate at the postganglionic level, as demonstrated for both cardiac sympathetic and enteric innervation [3, 4]. These two postganglionic structures can be investigated in living patients

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

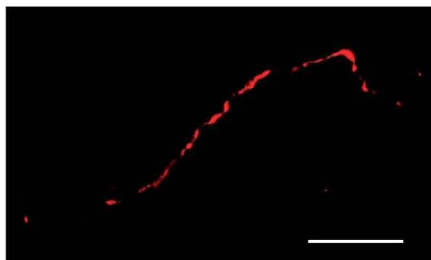


Fig. 1. Identification of Lewy neurites in the colonic submucosa using phospho-alpha-synuclein immunostaining; scale bar 50 μ m.

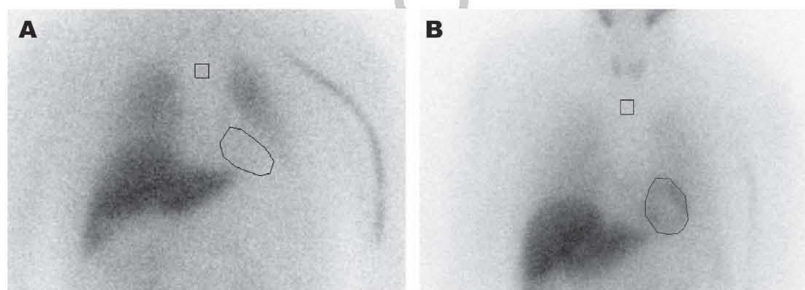


Fig. 2. Anterior planar imaging of the myocardial MIBG-SPECT acquired 15 minutes after intravenous injection of ^{123}I -MIBG in our patient (A) and in a healthy subject (B). The regions of interest are depicted (heart: circle; mediastinum: square). Almost no radioactivity is detectable in the myocardium of our patient with GD-associated parkinsonism (myocardial/mediastinal uptake ratio of 1.15) as compared to a normal scintigraphy (myocardial/mediastinal ratio of 2).

using I-123-metaiodobenzylguanidine-single photon emission computed tomography (MIBG-SPECT) and colonic biopsies, respectively [5]. In the present report, these two methods were used in a patient with Gaucher-related parkinsonism to evaluate the involvement of peripheral autonomic systems.

A right-handed 50-year-old man of Spanish descent was referred to our neurology department due to progressive gait disturbance and tremor from which he suffered from one year. He had been diagnosed with GD type 1 at the age of 32 when the patient complained of persistent fatigue and his blood tests showed thrombopenia, high plasma level of chitotriosidase (2350 nmol/h/mL for a normal range of 4–76 nmol/h/mL) and a marked decrease in leukocyte β -glucosidase (glucocerebrosidase) activity (0.8 nmol/h/mg protein for a normal range of 6–12.5 nmol/h/mg protein).

On initial neurological examination, the patient presented with global bradykinesia, loss of arm swing, cogwheel rigidity of both upper and lower limbs

and mild bilateral postural tremor that were more pronounced on the right side. These motor signs were associated with non-motor symptoms including constipation, erectile dysfunction, pollakiuria, hands vasomotor dysfunction, vivid dreams suggestive of REM sleep disorder and hyposmia, scoring 68/360 on the non-motor symptoms scale [6]. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale-III decreased from 33 to 16/108 after treatment with a combination of rotigotine and levodopa. Apart from the dopaminergic medication, the only treatment given to the patient was imiglucerase on a biweekly basis.

Colonic biopsies used for the analysis of enteric Lewy pathology were taken during the course of a colonoscopy, which was routinely performed for colorectal screening. This study was approved by the local Ethical Committee (*Comité de protection des personnes Ouest IV, Nantes*) and written informed consent was obtained before the endoscopic procedure and the scintigraphy. Four biopsies, two in the descending and two in the ascending colon

were microdissected and processed for phosphorylated alpha-synuclein immunostaining as described previously [7]. Structures immunoreactive for phosphorylated alpha-synuclein were observed in the submucosa of all four biopsies (Fig. 1). Myocardial MIBG SPECT was abnormal with a decrease in both early and delayed myocardial/mediastinal uptake ratio (1.15 and 1.00, respectively; Fig. 2A) as compared to a normal scintigraphy with a myocardial/mediastinal ratio of 2 (Fig. 2B).

Although the occurrence of cardiac sympathetic denervation has already been reported in GD-associated parkinsonism [8, 9], our case report is the first to demonstrate the presence of enteric Lewy pathology in such a case. The structures immunoreactive for phosphorylated alpha-synuclein observed in the submucosal plexus in our case of GD-associated parkinsonism were similar in every respect to the ones described in sporadic PD and were highly reminiscent of Lewy neurites [7, 10, 11].

Since its first description more than 15 years ago [12], the clinical and pathological features of GD-associated parkinsonism has been refined [1]. Although parkinsonian symptoms in patients with GD were initially thought to be more severe and poorly responsive to levodopa [12], subsequent studies reported that most patients with GD-associated parkinsonism had typical PD features with respect to the motor phenotype and levodopa responsiveness but also the early and frequent occurrence of non-motor symptoms such as hyposmia, constipation, and executive dysfunction [1]. From a pathological point of view, recent findings from brain autopsy studies showed that the pathological hallmark of sporadic PD, namely Lewy bodies and neurites, were also found in the central nervous system of GD patients with parkinsonism [2].

Some case reports have shown that familial PD caused by mutation of the gene encoding LRRK2 and alpha-synuclein or by alpha-synuclein gene triplication also features cardiac sympathetic denervation [13–15]. Our case report, by showing the involvement of the peripheral autonomic nervous system in Gaucher-related parkinsonism further strengthens the similarities between sporadic PD and genetic forms of the disease and might therefore provide new insight into PD pathogenesis. A current hypothesis postulates that an as yet unidentified external agent might set off the disease process in enteric neurons further spreading to the central nervous system via the vagal preganglionic innervation of the gut [16]. That enteric lesions are found in patients who present

with a genetic form of parkinsonism goes against this notion and would instead support the hypothesis that the widespread distribution of Lewy pathology in PD results from the simultaneous involvement of a subtype of neurons that are selectively vulnerable to alpha-synuclein accumulation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a Biomarker Grant from the Michael J Fox Foundation for Parkinson's Research.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- [1] Sidransky E, & Lopez G (2012) The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurology*, **11**, 986-998.
- [2] Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Lwin A, Colegial C, Allman JM, & Schiffmann R (2004) Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab*, **82**, 192-207.
- [3] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White III CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, & Walker DG (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica*, **119**, 689-702.
- [4] Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, & Takahashi H (2008) Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*, **131**, 642-650.
- [5] Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & Derkinderen P (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*, **22**, e11-e14.
- [6] Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Brown RG, Sethi K, Stocchi F, Odin P, Ondo W, Abe K, Macphee G, Macmahon D, Barone P, Rabey M, Forbes A, Breen K, Thuk S, Naidu Y, Olanow W, Williams AJ, Thomas S, Rye D, Tsuboi Y, Hand A, & Schapira AH (2007) The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: Results from an international pilot study. *Mov Disord*, **22**, 1901-1911.
- [7] Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, Nguyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, & Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*, **5**, e12728.
- [8] Itokawa K, Tamura N, Kawai N, Shimazu K, & Ishii K (2006) Parkinsonism in type I Gaucher's disease. *Intern Med*, **45**, 1165-1167.
- [9] Li Y, Sekine T, Funayama M, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, & Hattori N (2013) Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, doi:pii: S0197-4580(13)00421-1.

- [10] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Varannes des SB, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, & Derkinderen P (2012) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **45**, 305-309.
- [11] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Varannes des SB, Neunlist M, & Derkinderen P (2012) A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil*, **24**, e202-e205.
- [12] Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, & Zimran A (1996) Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *Qjm*, **89**, 691-694.
- [13] Goldstein DS, Imrich R, Peckham E, Holmes C, Lopez G, Crews C, Hardy J, Singleton A, & Hallett M (2007) Neurocirculatory and nigrostriatal abnormalities in Parkinson disease from LRRK2 mutation. *Neurology*, **69**, 1580-1584.
- [14] Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, Li ST, Holmes C, Dendi R, Hardy J, Singleton A, Crawley A, & Goldstein DS (2004) Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain*, **127**, 768-772.
- [15] Tijero B, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Fernández-González C, Somme J, Llorens V, Martínez A, Ruiz-Martínez J, Foncía N, Escalza I, Berganzo K, Aniel-Quiroga MA, Ruiz V, Terán N, Kaufmann H, & Zarranz JJ (2013) Cardiac sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation in the α synuclein gene. *Parkinsonism & Related Disorders*, **19**, 95-100.
- [16] Braak H, de Vos RA, Bohl J, & Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*, **396**, 67-72.

AUTHOR COPY

Bibliographie

- Abdo H., Derkinderen P., Gomes P., Chevalier J., Aubert P., Masson D., Galmiche J.-P. P., Berghe P. Vanden, Neunlist M., Lardeux B. (2010) Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *Faseb J* **24**, 1082–1094.
- Abdo H., Mahé M. M., Derkinderen P., Bach-Ngohou K., Neunlist M., Lardeux B. (2012) The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J. Physiol.* **590**, 2739–50.
- Aikawa H., Suzuki K. (1985) Enteric gliopathy in niacin-deficiency induced by CNS gliotoxin. *Brain Res.* **334**, 354–356.
- Albuerne M., Mammola C. L., Naves F. J., Levanti B., Germana G., Vega J. A. (1998) Immunohistochemical localization of S100 proteins in dorsal root, sympathetic and enteric ganglia of several mammalian species, including man. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **3**, 243–253.
- Al-Sadi R., Khatib K., Guo S., Ye D., Youssef M., Ma T. (2011) Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G1054–64.
- Anitha M., Gondha C., Sutliff R., Parsadonian A., Mwangi S., Sitaraman S. V., Srinivasan S. (2006) GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest* **116**, 344–356.
- Arnott I. D., Kingstone K., Ghosh S. (2000) Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**, 1163–1169.
- Aube A. C., Cabarrocas J., Bauer J., Philippe D., Aubert P., Doulay F., Liblau R., et al. (2006) Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55**, 630–637.
- Avetisyan M., Schill E. M., Heuckeroth R. O. (2015) Building a second brain in the bowel. **125**, 1–9.
- Bach-Ngohou K., Mahé M. M., Aubert P., Abdo H., Boni S., Bourreille A., Denis M. G., Lardeux B., Neunlist M., Masson D. (2010) Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J. Physiol.* **588**, 2533–2544.
- Bakke M., Larsen S. L., Lautrup C., Karlsborg M. (2011) Orofacial function and oral health in patients with Parkinson's disease. *Eur. J. Oral Sci.* **119**, 27–32.
- Bandyopadhyay U., Sridhar S., Kaushik S., Kiffin R., Cuervo A. M. (2010) Identification of Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol. Cell* **39**, 535–547.
- Barrett J. C., Hansoul S., Nicolae D. L., Cho J. H., Duerr R. H., Rioux J. D., Brant S. R., et al. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* **40**, 955–962.

- Bassotti G., Villanacci V., Maurer C. A., Fisogni S., Fabio F. Di, Cadei M., Morelli A., Panagiotis T., Cathomas G., Salerni B. (2006) The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* **55**, 41–46.
- Bayliss W. M., Starling E. H. (1899) The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* **26**, 125–138.
- Beach T. G., Adler C. H., Sue L. I., Vedders L., Lue L. F., White lli C. L., Akiyama H., et al. (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* **119**, 689–702.
- Benarroch E. E. (2007) Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology* **69**, 1953–1957.
- Bergelson J. M., Cunningham J. a, Droguett G., Kurt-Jones E. a, Krithivas a, Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320–1323.
- Berthoud H. R., Neuhuber W. L. (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Aut. Neurosci* **85**, 1–17.
- Bertiaux-Vandaële N., Youmba S. B., Belmonte L., Leclaire S., Antonietti M., Gourcerol G., Leroi A.-M., et al. (2011) The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 2165–73.
- Bevins C. L., Salzman N. H. (2011) Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 356–368.
- Bialecka M., Kurzawski M., Klodowska-Duda G., Opala G., Juzwiak S., Kurzawski G., Tan E. K., Drozdziak M. (2007) CARD15 variants in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Res* **57**, 473–476.
- Blechingberg J., Holm I. D. A. E., Nielsen K. B., Jensen T. H., Jørgensen A. L., Nielsen A. L. (2007) Identification and Characterization of GFAP kappa, a Novel Glial Fibrillary Acidic Protein Isoform. *Glia* **507**, 497–507.
- Boesmans W., Cirillo C., Abbeel V. Van den, Haute C. Van den, Depoortere I., Tack J., Berghe P. Vanden (2013) Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterol. Motil.* **25**, 151–160.
- Boesmans W., Lasrado R., Berghe P. Vanden, Pachnis V. (2015) Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* **63**, 229–41.
- Bohórquez D. V., Samsa L. a., Roholt A., Medicetty S., Chandra R., Liddle R. a. (2014) An enteroendocrine cell - Enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* **9**.
- Bondurand N., Sham M. H. (2013) The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev. Biol.* **382**, 330–343.

- Boyen G. B. T. von, Schulte N., Pflüger C., Spaniol U., Hartmann C., Steinkamp M. (2011) Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* **11**, 3.
- Boyen G. B. T. von, Steinkamp M., Reinshagen M., Schäfer K.-H., Adler G., Kirsch J., Schafer K. H., Adler G., Kirsch J. (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* **53**, 222–228.
- Braak H., Tredici K. Del, Rüb U., Vos R. a I. de, Jansen Steur E. N. H., Braak E., Rub U., Vos R. a I. de, Jansen Steur E. N. H., Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197–211.
- Braak H., Vos R. a I. de, Bohl J., Tredici K. Del (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* **396**, 67–72.
- Bradley J. S. J., Parr E. J., Sharkey K. A. (1997) Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* **289**, 455–461.
- Brenner M., Johnson a B., Boespflug-Tanguy O., Rodriguez D., Goldman J. E., Messing a (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat. Genet.* **27**, 117–120.
- Britsch S., Goerich D. E., Riethmacher D., Peirano R. I., Rossner M., Nave K.-A., Birchmeier C., Wegner M. (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* **15**, 66–78.
- Broadhead M. J., Bayguinov P. O., Okamoto T., Heredia D. J., Smith T. K. (2012) Ca²⁺ transients in myenteric glial cells during the colonic migrating motor complex in the isolated murine large intestine. *J. Physiol.* **2**, 335–350.
- Buning C., Geissler N., Prager M., Sturm A., Baumgart D. C., Buttner J., Buhner S., Haas V., Lochs H. (2012) Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease? *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 1932–1939.
- Bush T. G., Savidge T. C., Freeman T. C., Cox H. J., Campbell E. a., Mucke L., Johnson M. H., Sofroniew M. V. (1998) Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* **93**, 189–201.
- Cabarrocas J., Savidge T. C., Liblau R. S. (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**, 81–93.
- Cameron H. L., Perdue M. H. (2007) Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 47–56.
- Capaldo C. T., Macara I. G. (2007) Depletion of E-Cadherin Disrupts Establishment but Not Maintenance of Cell Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* **18**, 189–200.
- Carotti S., Morini S., Corradini S. G., Burza M. A., Molinaro A., Carpino G., Merli M., et al. (2007) Glial Fibrillary Acidic Protein as an Early Marker of Hepatic Stellate Cell

- Activation in Chronic and Posttransplant Recurrent Hepatitis C. *Liver Transplant.* **13**, 465–466.
- Cash H. L., Whitham C. V., Behrendt C. L., Hooper L. V (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* **313**, 1126–1130.
- Cersosimo M. G., Raina G. B., Calandra C. R., Pellene A., Gutiérrez C., Micheli F. E., Benarroch E. E. (2011) Dry mouth: An overlooked autonomic symptom of Parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* **1**, 169–173.
- Cersosimo M. G., Raina G. B., Pecci C., Pellene A., Calandra C. R., Gutiérrez C., Micheli F. E., Benarroch E. E. (2013) Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol* **260**, 1332–1338.
- Cheadle G. a., Costantini T. W., Lopez N., Bansal V., Eliceiri B. P., Coimbra R. (2013) Enteric Glia Cells Attenuate Cytomix-Induced Intestinal Epithelial Barrier Breakdown. *PLoS One* **8**, 1–11.
- Chen M.-H., Hagemann T. L., Quinlan R. a, Messing A., Perng M.-D. (2013) Caspase cleavage of GFAP produces an assembly-compromised proteolytic fragment that promotes filament aggregation. *ASN Neuro* **5**, 1–19.
- Cheng K., Samimi R., Xie G., Shant J., Drachenberg C., Wade M., Davis R. J., Nomikos G., Raufman J.-P. (2008) Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G591–7.
- Clevers H. C., Bevins C. L. (2013) Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 289–311.
- Condorelli D. F., Nicoletti V. G., Dell'Albani P., Barresi V., Caruso a, Conticello S. G., Belluardo N., Giuffrida Stella a M. (1999) GFAPbeta mRNA expression in the normal rat brain and after neuronal injury. *Neurochem. Res.* **24**, 709–714.
- Cooke H. J. (2000) Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **915**, 77–80.
- Cornet A., Savidge T. C., Cabarrocas J., Deng W. L., Colombel J. F., Lassmann H., Desreumaux P., Liblau R. S. (2001) Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13306–13311.
- Coss-Adame E., Rao S. S. C. (2014) Brain and gut interactions in irritable bowel syndrome: new paradigms and new understandings. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **16**, 379.
- Costantini T. W., Bansal V., Krzyzaniak M., Putnam J. G., Peterson C. Y., Loomis W. H., Wolf P., Baird A., Eliceiri B. P., Coimbra R. (2010) Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, G1308–G1318.
- Costantini T. W., Krzyzaniak M., Cheadle G. a., Putnam J. G., Hageny A. M., Lopez N., Eliceiri B. P., Bansal V., Coimbra R. (2012) Targeting α -7 nicotinic acetylcholine

- receptor in the enteric nervous system: A cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am. J. Pathol.* **181**, 478–486.
- Crawley S. W., Mooseker M. S., Tyska M. J. (2014) Shaping the intestinal brush border. *J. Cell Biol.* **207**, 441–451.
- Crosnier C., Stamatakis D., Lewis J. (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 349–359.
- Cruts M., Hendriks L., Broeckhoven C. Van (1996) The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Hum. Mol. Genet.* **5 Spec No**, 1449–1455.
- Damier P., Hirsch E. C., Zhang P., Agid Y., Agid Y., Javoy-Agid F. (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* **52**, 1–6.
- Davies K. N., King D., Billington D., Barrett J. A. (1996) Intestinal permeability and orocaecal transit time in elderly patients with Parkinson's disease. *Postgrad. Med. J.* **72**, 164–167.
- Deckx R. J., Vantrappen G. R., Parein M. M. (1967) Localization of lysozyme activity in a Paneth cell granule fraction. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* **139**, 204–207.
- Derkinderen P., Rouaud T., Lebouvier T., Bruley des Varannes S., Neunlist M., Giorgio R. De, Shprecher D. R., Derkinderen P. (2012) Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology* **78**, 1761–1767.
- Devos D., Lebouvier T., Lardeux B., Biraud M., Rouaud T., Pouclet H., Coron E., et al. (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **50**, 42–48.
- Donato R., Cannon B. R., Sorci G., Riuzzi F., Hsu K., Weber D. J., Geczy C. L. (2013) Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57.
- Eddelston M., Mucke L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes - Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**, 15–36.
- Elobeid a., Bongcam-Rudloff E., Westermark B., Nistér M. (2000) Effects of inducible glial fibrillary acidic protein on glioma cell motility and proliferation. *J. Neurosci. Res.* **60**, 245–256.
- Eng L. F., Lee Y. L., Kwan H., Brenner M., Messing A. (1998) Astrocytes cultured from transgenic mice carrying the added human glial fibrillary acidic protein gene contain rosenthal fibers. *J. Neurosci. Res.* **53**, 353–360.
- Fasano A., Visanji N. P., Liu L. W. C., Lang A. E., Pfeiffer R. F. (2015) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **14**, 625–639.
- Ferri G. L., Probert L., Cocchia D., Michetti F., Marangos P. J., Polak J. M. (1982) Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* **297**, 409–410.
- Flamant M., Aubert P., Rolli-Derkinderen M., Bourreille A., Neunlist M. R., Mahé M. M., Meurette G., et al. (2011) Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* **60**, 473–484.

- Flynn A., Kane S. (2011) Mucosal healing in Crohn's disease and ulcerative colitis: what does it tell us? *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**, 342–345.
- Forsyth C. B., Shannon K. M., Kordower J. H., Voigt R. M., Shaikh M., Jaglin J. a., Estes J. D., Dodiya H. B., Keshavarzian A. (2011) Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* **6**, e28032.
- Fujita K., Kato T., Yamauchi M., Ando M., Honda M., Nagata Y. (1998) Increases in fragmented glial fibrillary acidic protein levels in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem. Res.* **23**, 169–174.
- Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M. S., Shen J., Takio K., Iwatsubo T. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* **4**, 160–164.
- 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**, 286–94.
- Furness J. B., Clerc N., Lomax a E., Bornstein J. C., Kunze W. a (2000) Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* **300**, 383–387.
- Furness J. B., Kunze W. A., Clerc N. (1999) Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol* **277**, G922–8.
- Furuse M., Fujita K., Hiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence homology to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539–1550.
- Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **156**, 1099–1111.
- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi a., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777–1788.
- Gabella G. (1972) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat* **111**, 69–97.
- Gassler N., Rohr C., Schneider A., Kartenbeck J., Bach A., Obermüller N., Otto H. F., Autschbach F. (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G216–28.
- Gomi H., Yokoyama T., Fujimoto K., Ikeda T., Katoh A., Itoh T., Itohara S. (1995) Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* **14**, 29–41.

- Goode T., O'Connor T., Hopkins A., Moriarty D., O'Sullivan G. C., Collins J. K., O'Donoghue D., Baird A. W., O'Connell J., Shanahan F. (2003) Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J. Cell. Physiol.* **197**, 30–41.
- Gulbransen B. D., Sharkey K. a. (2012) Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 625–632.
- Hajós F. (2008) Changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity reflect neuronal states. *Neurochem. Res.* **33**, 1643–1650.
- Hartmann A., Hunot S., Hirsch E. C. (2003) Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. *Exp Neurol* **184**, 561–564.
- Hayden U. L., Carey H. V (2000) Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, R1589–R1594.
- Heanue T. a, Pachnis V. (2007) Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* **8**, 466–479.
- Helander H. F., Fändriks L. (2014) Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand. J. Gastroenterol.* **49**, 681–9.
- Herskowitz J. H., Seyfried N. T., Duong D. M., Xia Q., Rees H. D., Gearing M., Peng J., Lah J. J., Levey A. I. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals site-specific changes in GFAP and NDRG2 phosphorylation in frontotemporal lobar degeneration. *J. Proteome Res.* **9**, 6368–6379.
- Heuvel E. de, Wallace L., Sharkey K. a., Sigalet D. L. (2012) Glucagon-like peptide 2 induces vasoactive intestinal polypeptide expression in enteric neurons via phosphatidylinositol 3-kinase- signaling. *AJP Endocrinol. Metab.* **303**, E994–E1005.
- Hol E. M., Roelofs R. F., Moraal E., Sonnemans M. A. F., Sluijs J. A., Proper E. a, Graan P. N. E. de, Fischer D. F., Leeuwen F. W. van (2003) Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol Psychiatry* **8**, 786–796.
- Hollander D. (1999) Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **1**, 410–416.
- Hopkins D. A., Bieger D., deVente J., Steinbusch W. M. (1996) Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog Brain Res* **107**, 79–96.
- Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **171**, 939–45.
- Inagaki M., Gonda Y., Nishizawa K., Kitamura S., Sato C., Ando S., Tanabe K., Kikuchi K., Tsuiki S., Nishi Y. (1990) Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-??-helical head domain. *J. Biol. Chem.* **265**, 4722–4729.

- Inagaki M., Nakamura Y., Takeda M., Nishimura T., Inagaki N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* **4**, 239–243.
- Jeon M. K., Klaus C., Kaemmerer E., Gassler N. (2013) Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **4**, 94–9.
- Jessen K. R., Mirsky R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* **286**, 736–737.
- Jessen K. R., Mirsky R. (1983) Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci.* **3**, 2206–2218.
- Jessen K. R., Mirsky R. (1985) Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J. Neuroimmunol.* **8**, 377–393.
- Jessen K. R., Mirsky R. (1992) Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 575–581.
- Jin Z., Fu Z., Yang J., Troncosco J., Everett A. D., Eyk J. E. Van (2013) Identification and characterization of citrulline-modified brain proteins by combining HCD and CID fragmentation. *Proteomics* **13**, 2682–2691.
- Johansson M. E. V, Ambort D., Pelaseyed T., Schütte A., Gustafsson J. K., Ermund A., Subramani D. B., et al. (2011) Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3635–3641.
- Johansson M. E. V., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G. C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15064–15069.
- Jones D. E., Bevins C. L. (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 23216–23225.
- Kalf J. G., Swart B. J. M. De, Bloem B. R., Munneke M. (2012) Parkinsonism and Related Disorders Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson ' s disease : A meta-analysis. *Park. Relat. Disord.* **18**, 311–315.
- Kamphuis W., Mamber C., Moeton M., Kooijman L., Sluijs J. a., Jansen A. H. P., Verveer M., et al. (2012) GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One* **7**, e42823.
- Kamphuis W., Middeldorp J., Kooijman L., Sluijs J. A., Kooi E.-J., Moeton M., Freriks M., Mizze M. R., Hol E. M. (2014) Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 492–510.
- Kararli T. T. (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm. Drug Dispos.* **16**, 351–380.
- Kawajiri A., Yasui Y., Goto H., Tatsuka M., Takahashi M., Nagata K.-I., Inagaki M. (2003) Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1489–1500.

- Kirchgessner a L., Tamir H., Gershon M. D. (1992) Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J. Neurosci.* **12**, 235–248.
- Kirchgessner A. L., Gershon M. D. (1989) Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *J Comp Neurol* **285**, 38–53.
- Korolainen M. A., Auriola S., Nyman T. A., Alafuzoff I., Pirttilä T. (2005) Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis* **20**, 858–870.
- Kupsky W. J., Grimes M. M., Sweeting J., Bertsch R., Cote L. J. (1987) Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* **37**, 1253–1255.
- Kuzuhara S., Mori H., Izumiyama N., Yoshimura M., Ihara Y. (1988) Lewy bodies are ubiquitinated. *Acta Neuropathol.* **75**, 345–353.
- Lai S.-W., Liao K.-F., Lin C.-L., Sung F.-C. (2014) Irritable bowel syndrome correlates with increased risk of Parkinson's disease in Taiwan. *Eur. J. Epidemiol.* **29**, 57–62.
- Landeghem L. Van, Chevalier J., Mahé M. M., Wedel T., Urvil P., Derkinderen P., Savidge T., et al. (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–G987.
- Langley J. N., Magnus R. (1904) Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. *J. Physiol.* **33**, 34–51.
- Lau L. M. L. de, Breteler M. M. B. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **5**, 525–535.
- Lebouvier T., Coron E., Chaumette T., Paillusson S., Bruley des Varannes S., Neunlist M., Derkinderen P. (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* **22**, e11–4.
- Lees A. J., Selikhova M., Andrade L. A., Duyckaerts C. (2008) The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov. Disord.* **23**, 777–783.
- Lema Tomé C. M., Tyson T., Rey N. L., Grathwohl S., Britschgi M., Brundin P. (2012) Inflammation and α -Synuclein's Prion-like Behavior in Parkinson's Disease—Is There a Link? *Mol. Neurobiol.* **47**, 561–74.
- Lepekhin E. a., Eliasson C., Berthold C. H., Berezin V., Bock E., Pekny M. (2001) Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J. Neurochem.* **79**, 617–625.
- Lewis S. a, Balcarek J. M., Krek V., Shelanski M., Cowan N. J. (1984) Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 2743–2746.
- Li H., Guo Y., Teng J., Ding M., Yu A. C. H., Chen J. (2006) 14-3-3 γ affects dynamics and integrity of glial filaments by binding to phosphorylated GFAP. *J. Cell Sci.* **119**, 4452–4461.

- Liedtke W., Edelmann W., Bieri P. L., Chiu F. C., Cowan N. J., Kucherlapati R., Raine C. S. (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* **17**, 607–615.
- Liu D., Liu C., Li J., Azadzi K., Yang Y., Fei Z., Dou K., et al. (2013a) Proteomic analysis reveals differentially regulated protein acetylation in human amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *PLoS One* **8**.
- Liu Y. a., Chung Y. C., Pan S. T., Shen M. Y., Hou Y. C., Peng S. J., Pasricha P. J., Tang S. C. (2013b) 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil.* **25**, 324–338.
- Lowe J., Blanchard A., Morrell K., Lennox G., Reynolds L., Billett M., Landon M., Mayer R. J. (1988) Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in m. *J Pathol* **155**, 9–15.
- Madara J. L., Moore R., Carlson S. (1987) Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* **253**, C854–861.
- Magistris L. de, Familiari V., Pascotto A., Sapone A., Frolli A., Iardino P., Carteni M., et al. (2010) Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **51**, 418–424.
- Mamber C., Kozareva D. a., Kamphuis W., Hol E. M. (2013) Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Prog. Neurobiol.* **111**, 1–16.
- Marchiando A. M., Shen L., Graham W. V., Edelblum K. L., Duckworth C. a, Guan Y., Montrose M. H., Turner J. R., Watson A. J. M. (2011) The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* **140**, 1208–1218.e1–2.
- Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., et al. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* **142**, 117–127.
- Mawe B. Y. G. M. (1991) The role of cholecystokinin in ganglionic transmission in the quinea-pig gall-bladder. *J. Physiol.* **439**, 89–102.
- McCall M. a, Gregg R. G., Behringer R. R., Brenner M., Delaney C. L., Galbreath E. J., Zhang C. L., Pearce R. a, Chiu S. Y., Messing a (1996) Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6361–6366.
- McClain J. L., Vladimir Grubisic, Fried D., Gomez-Suarez R. A., Gina M. Leininger, Sévigny J., Parpura V., Gulbransen B. D. (2014) Responses in Enteric Glia Are Mediated by Connexin-43 Hemichannels and Modulate Colonic Transit in Mice , 2, *. 497–507.
- McGeer P. L., Itagaki S., Boyes B. E., McGeer E. G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285–1291.

- Mei N. (1985) Intestinal chemosensitivity. *Physiol Rev* **65**, 211–237.
- Meurette G., Blanchard C., Duchalais-Dassonneville E., Coquenlorge S., Aubert P., Wong M., Lehur P. a., Neunlist M. (2012) Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: Results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 267–274.
- Middeldorp J., Hol E. M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* **93**, 421–443.
- Nagahama M., Semba R., Tsuzuki M., Aoki E. (2001) L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* **10**, 336–340.
- Nakamura Y., Takedas M., Aimotoe S., Hojog H., Takaoe T., Shimonishie Y., Hariguchi S., Nishimura T., Tris M. (1992) Assembly Regulatory Domain of Glial Fibrillary Acidic Protein. *Biochemistry*, 23269–23274.
- Nasser Y., Fernandez E., Keenan C. M., Ho W., Oland L. D., Tibbles L. A., Schemann M., et al. (2006) Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G912–27.
- Nawashiro H., Messing a, Azzam N., Brenner M. (1998) Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. *Neuroreport* **9**, 1691–1696.
- Neunlist M., Aubert P., Bonnaud S., Landeghem L. Van, Coron E., Wedel T., Naveilhan P., et al. (2007) Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, 231–247.
- Neunlist M., Landeghem L. Van, Mahé M. M., Derkinderen P., Varannes S. B. des, Rolli-Derkinderen M. (2013) The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 90–100.
- Neunlist M., Rolli-Derkinderen M., Latorre R., Landeghem L. Van, Coron E., Derkinderen P., Giorgio R. De (2014) Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* **147**, 1230–7.
- Neunlist M., Toumi F., Oreschkova T., Denis M., Leborgne J., Laboisie C. L., Galmiche J.-P. P., 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.
- Nicholas A. P., King J. L., Sambandam T., Echols J. D., Gupta K. B., McInnis C., Whitaker J. N. (2003) Immunohistochemical localization of citrullinated proteins in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* **459**, 251–266.
- Nielsen A. L., Holm I. E., Johansen M., Bonven B., Jørgensen P., Jørgensen A. L. (2002) A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 29983–29991.
- Nussbaum R. L., Ellis C. E. (2003) Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1356–1364.
- Parkinson J. (1817) An essay on the shaking palsy. *London Whittingham Rowl.*

- Pekny M., Eliasson C., Chien C. L., Kindblom L. G., Liem R., Hamberger a, Betsholtz C. (1998a) GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp. Cell Res.* **239**, 332–343.
- Pekny M., Levéen P., Pekna M., Eliasson C., Berthold C. H., Westermark B., Betsholtz C., et al. (1995) Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* **14**, 1590–1598.
- Pekny M., Stanness K. a., Eliasson C., Betsholtz C., Janigro D. (1998b) Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* **22**, 390–400.
- Perea G., Araque A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* **317**, 1083–1086.
- Perng M. D., Cairns L., IJssel P. van den, Prescott a, Hutcheson a M., Quinlan R. a (1999) Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 1)**, 2099–2112.
- Perng M. Der, Su M., Wen S. F., Li R., Gibbon T., Prescott A. R., Brenner M., Quinlan R. a (2006) The Alexander disease-causing glial fibrillary acidic protein mutant, R416W, accumulates into Rosenthal fibers by a pathway that involves filament aggregation and the association of alpha B-crystallin and HSP27. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 197–213.
- Pfeiffer R. F. (2003) Review Gastrointestinal dysfunction in Parkinson ' s disease. **2**, 107–116.
- Piche T., Barbara G., Aubert P., Bruley des Varannes S., Dainese R., Nano J. L., Cremon C., et al. (2009) Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* **58**, 196–201.
- Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Hollmann M., Glutamate I., Silva A. J., Stevens C. F., Tonegawa S., et al. (1997) Mutation in the alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson ' s Disease. *Science (80-.).* **276**, 2045–2048.
- Potokar M., Kreft M., Li L., Andersson J. D., Pangršič T., Chowdhury H. H., Pekny M., Zorec R. (2007) Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic* **8**, 12–20.
- Potokar M., Stenovec M., Gabrijel M., Li L., Kreft M., Grilc S., Pekny M., Zorec R. (2010) Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia* **58**, 1208–1219.
- Pouclet H., Lebouvier T., Coron E., Rouaud T., Flamant M., Toulgoat F., Roy M., et al. (2012a) Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Park. Relat Disord* **18**, 893–895.
- Pouclet H., Lebouvier T., Coron E., Varannes S. B. des, Rouaud T., Roy M., Neunlist M., et al. (2012b) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **45**, 305–309.
- Pringsheim T., Jette N., Frolkis A., Steeves T. D. L. (2014) The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **29**, 1583–1590.

- Qualman S. J., Haupt H. M., Yang P., Hamilton S. R. (1984) Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* **87**, 848–856.
- Quinlan R. a, Moir R. D., Stewart M. (1989) Expression in Escherichia coli of fragments of glial fibrillary acidic protein: characterization, assembly properties and paracrystal formation. *J. Cell Sci.* **93 (Pt 1)**, 71–83.
- Reddix R., Kuhawara A., Wallace L., Cooke H. J. (1994) Vasoactive intestinal polypeptide: a transmitter in submucous neurons mediating secretion in guinea pig distal colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 1124–1129.
- Reeves S. a, Helman L. J., Allison a, Israel M. a (1989) Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5178–5182.
- Riol H., Tardy M., Rolland B., Lévesque G., Murthy M. R. (1997) Detection of the peripheral nervous system (PNS)-type glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its mRNA in human lymphocytes. *J. Neurosci. Res.* **48**, 53–62.
- Roelofs R. F., Fischer D. F., Houtman S. H., Sluijs J. A., Haren W. Van, Leeuwen F. W. Van, Hol E. M. (2005) Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia* **52**, 289–300.
- Ross G. W., Abbott R. D., Petrovitch H., Tanner C. M., White L. R. (2012) Pre-motor features of Parkinson's disease: the Honolulu-Asia Aging Study experience. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18**, S199–S202.
- Rühl A., Franzke S., Collins S. M., Stremmel W. (2001) Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1163–G1171.
- Rühl A., Ruhl A., Rühl A. (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* **17**, 777–790.
- Ruhl A., Trotter J., Stremmel W. (2001) Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 95–106.
- Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Fromm M., Takano H., Noda T., Tsukita S., et al. (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4131–4142.
- Salat-Foix D., Tran K., Ranawaya R., Meddings J., Suchowersky O. (2012) Increased intestinal permeability and Parkinson disease patients: chicken or egg? *Can J Neurol Sci* **39**, 185–188.
- Salzman N. H., Hung K., Haribhai D., Chu H., Karlsson-Sjöberg J., Amir E., Tegatz P., et al. (2010) Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* **11**, 76–83.
- Sancho E., Batlle E., Clevers H. (2003) Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 763–770.

- Savidge T. C., Newman P., Pothoulakis C., Ruhl A., Neunlist M., Bourreille A., Hurst R., Sofroniew M. V. (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358.
- Sekimata M., Tsujimura K., Tanaka J., Takeuchi Y., Inagaki N., Inagaki M. (1996) Detection of protein kinase activity specifically activated at metaphase-anaphase transition. *J. Cell Biol.* **132**, 635–641.
- Sharkey K. A. (2015) Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J. Clin. Invest.* **3**, 918–925.
- Shirazi-Beechey S. P., Moran a W., Batchelor D. J., Daly K., Al-Rammahi M. (2011) Influences of food constituents on gut health Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc. Nutr. Soc.* **70**, 185–193.
- Sihag R. K., Inagaki M., Yamaguchi T., Shea T. B., Pant H. C. (2007) Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp. Cell Res.* **313**, 2098–2109.
- Sjövall H., Abrahamsson H., Westlander G., Gillberg R., Redfors S., Jodal M., Lundgren O. (1986) Intestinal fluid and electrolyte transport in man during reduced circulating blood volume. *Gut* **27**, 913–918.
- Sluis M. Van der, Koning B. a E. De, Bruijn A. C. J. M. De, Velcich A., Meijerink J. P. P., Goudoever J. B. Van, Büller H. a., et al. (2006) Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* **131**, 117–129.
- Soderholm J. D., Olaison G., Peterson K. H., Franzen L. E., Lindmark T., Wiren M., Tagesson C., Sjobahl R. (2002) Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* **50**, 307–313.
- Sofroniew M. V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**, 638–647.
- Song Y. J. C., Halliday G. M., Holton J. L., Lashley T., O'Sullivan S. S., McCann H., Lees A. J., et al. (2009) Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 1073–1083.
- Spillantini M. G., Crowther R. A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. (1998) Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson ' s disease and dementia with Lewy bodies. *PNAS* **95**, 6469–6473.
- 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.
- Steinkamp M., Geerling I., Seufferlein T., Boyen G. von, Egger B., Grossmann J., Ludwig L., Adler G., Reinshagen M. (2003) Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **124**, 1748–1757.
- Sternini C., Anselmi L., Rozengurt E. (2008) Enteroendocrine cells: a site of “taste” in gastrointestinal chemosensing. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **15**, 73–78.

- Sullivan S. M., Sullivan R. K. P., Miller S. M., Ireland Z., Björkman S. T., Pow D. V., Colditz P. B. (2012) Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res* **37**, 2364–2378.
- Suzuki T. (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* **70**, 631–659.
- Suzuki T., Elias B. C., Seth A., Shen L., Turner J. R., Giorgianni F., Desiderio D., Guntaka R., Rao R. (2009) PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 61–66.
- Szeverenyi I., Cassidy A. J., Cheuk W. C., Lee B. T. K., Common J. E. a, Ogg S. C., Chen H., et al. (2008) The human intermediate filament database: Comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum. Mutat.* **29**, 351–360.
- Takemura M., Gomi H., Colucci-Guyon E., Itohara S. (2002) Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. *J. Neurosci.* **22**, 6972–6979.
- Tanaka H., Katoh A., Oguro K., Shimazaki K., Gomi H., Itohara S., Masuzawa T., Kawai N. (2002) Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. *J. Neurosci. Res.* **67**, 11–20.
- Taupin D., Podolsky D. K. (2003) Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 721–732.
- Thannickal T. C., Lai Y.-Y., Siegel J. M. (2007) Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain* **130**, 1586–95.
- Theis M., Giaume C. (2012) Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* **1487**, 88–98.
- Timmermans J. P., Adriaensen D., Cornelissen W., 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.
- Toda M., Miura M., Asou H., Toya S., Uyemura K. (1994) Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by glial fibrillary acidic protein cDNA transfection. *J. Neurochem.* **63**, 1975–1978.
- Toumi F., Neunlist M., Cassagnau E., Parois S., Laboisie C. L., Galmiche J. P., Jarry A. (2003) Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* **15**, 239–242.
- Tsujimura K., Tanaka J., Ando S., Matsuoka Y., Kusubata M., Sugiura H., Yamauchi T., Inagaki M. (1994) Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biochem.* **116**, 426–434.
- Turner J. R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 799–809.

- Vaarala O. (2008) Leaking gut in type 1 diabetes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **24**, 701–706.
- Velcich A., Yang W., Heyer J., Fragale A., Nicholas C., Viani S., Kucherlapati R., Lipkin M., Yang K., Augenlicht L. (2002) Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* **295**, 1726–1729.
- Visanji N. P., Marras C., Hazrati L.-N., Liu L. W. C., Lang A. E. (2014) Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov Disord* **29**, 444–450.
- Wakabayashi K., Hayashi S., Kakita A., Yamada M., Toyoshima Y., Yoshimoto M., Takahashi H. (1998) Accumulation of α -synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* **96**, 445–452.
- Wakabayashi K., Hayashi S., Yoshimoto M., Kudo H., Takahashi H. (2000) NACP/alpha-synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol.* **99**, 14–20.
- 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.
- 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.
- Wakabayashi K., Tanji K., Odagiri S., Miki Y., Mori F., Takahashi H. (2012) The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Mol. Neurobiol.*, 1–14.
- Wallon C., Braaf Y., Wolving M., Olaison G., Söderholm J. D. (2005) Endoscopic biopsies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon. *Scand J Gastroenterol* **40**, 586–595.
- Walter G. C., Phillips R. J., Baronowsky E. A., Powley T. L. (2009) Versatile, high-resolution anterograde labeling of vagal efferent projections with dextran amines. *J Neurosci Methods* **178**, 1–9.
- Weinstein D. E., Shelanski M. L., Liem R. K. H. (1991) Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell Biol.* **112**, 1205–1213.
- Wright K., Rooney N., Feeney M., Tate J., Robertson D., Welham M., Ward S. (2005) Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* **129**, 437–453.
- Yokobori S., Zhang Z., Moghieb A., Mondello S., Gajavelli S., Dietrich W. D., Bramlett H., et al. (2013) Acute Diagnostic Biomarkers for Spinal Cord Injury: Review of the Literature and Preliminary Research Report. *World Neurosurg.* **83**, 1–12.
- Yoshida T., Tomozawa Y., Arisato T., Okamoto Y., Hirano H., Nakagawa M. (2007) The functional alteration of mutant GFAP depends on the location of the domain:

- Morphological and functional studies using astrocytoma-derived cells. *J. Hum. Genet.* **52**, 362–369.
- Young H. M., Bergner A. J., Müller T., Muller T. (2003) Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* **456**, 1–11.
- Young R. L. (2011) Sensing via intestinal sweet taste pathways. *Front. Neurosci.* **5**, 1–13.
- Yu Y.-B., Li Y.-Q. (2014) Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J. Gastroenterol.* **20**, 11273.
- Zelenika D., Grima B., Brenner M., Pessac B. (1995) A novel glial fibrillary acidic protein mRNA lacking exon 1. *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 251–258.
- Zhang D. K., He F. Q., Li T. K., Pang X. H., Cui D. J., Xie Q., Huang X. L., Gan H. T. (2010) Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J. Pathol.* **222**, 213–222.
- Zhang Z., Zoltewicz J. S., Mondello S., Newsom K. J., Yang Z., Yang B., Kobeissy F., et al. (2014) Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *PLoS One* **9**, 1–16.

Thèse de Doctorat

Thomas CLAIREMBAULT

Caractérisation de l'atteinte de l'unité neuro-glio-épithéliale entérique dans la maladie de Parkinson à travers l'utilisation de biopsies épithéliales coliques humaines.

Investigation of the enteric neuro-glio-epithelial unit alterations in Parkinson's disease through human epithelial colonic biopsies.

Résumé

Des altérations fonctionnelles et morphologiques de l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE) entérique sont décrites depuis longtemps dans des pathologies digestives comme le syndrome de l'intestin irritable ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Il est désormais bien établi que la maladie de Parkinson (MP) n'est pas seulement une maladie du cerveau mais est aussi une maladie digestive. Les symptômes gastro-intestinaux sont fréquents et prématurés dans la MP et ils pourraient être impliqués de façon critique dans le développement précoce de la maladie. Dans la MP les neurones entériques accumulent de l' α -synucléine, la signature spécifique de la MP, c'est la raison pour laquelle nous avons enquêté à travers ce travail de thèse sur la réactivité gliale entérique en évaluant les niveaux d'expression et de phosphorylation de la protéine GFAP dans des biopsies coliques de parkinsoniens. En parallèle nous avons également étudié les éventuelles altérations des fonctions et de morphologie de la barrière épithéliale intestinale (BEI) en mesurant les perméabilités para- et transcellulaires dans les biopsies coliques et en évaluant l'expression et la localisation cellulaire de deux protéines des jonctions serrées ZO-1 et l'occludine. Comparés aux contrôles, les parkinsoniens avaient une surexpression significative de la GFAP entérique alors que les niveaux de phosphorylation sur la sérine 13 étaient significativement plus bas. Les perméabilités para- et transcellulaires n'étaient pas modifiées chez les parkinsoniens. L'expression de l'occludine, mais pas de ZO-1, était significativement plus basse chez les patients MP comparés aux témoins et la localisation cellulaire de ces deux protéines était altérée chez les parkinsoniens. Nos données apportent ainsi de nouvelles preuves sur l'atteinte de l'UNGE dans la MP via l'accumulation d' α -synucléine dans les neurones entériques, l'activation gliale entérique et les altérations morphologiques de la BEI. Ce travail de thèse renforce ainsi le rôle potentiel joué par le tube digestif dans l'initiation et/ou la progression de la MP.

Mots clés

Maladie de Parkinson, unité neuro-glio-épithéliale, système nerveux entérique, barrière épithéliale intestinale, cellules gliales entériques, GFAP, jonctions serrées, occludine, ZO-1.

Abstract

Functional and morphological alterations of the enteric neuro-glio-epithelial unit (NGEU) have been consistently reported in digestive disorders such as irritable bowel syndrome or inflammatory bowel disease. There is mounting evidence that Parkinson's disease (PD) is not only a brain disease but also a gut disorder. Gastrointestinal involvement is a frequent and early event in the course of PD, and it may be critically involved in the early development of the disease. As in PD the enteric neurons accumulate α -synuclein, and thus are showing PD specific pathological features, we undertook the present PhD work to investigate whether the enteric glia in PD become reactive by assessing the expression and phosphorylation levels of GFAP protein in colonic biopsies. In parallel we investigated whether changes in the intestinal epithelial barrier (IEB) function and/or morphology occur in PD by measuring the para- and transcellular permeabilities in colonic biopsies and by assessing the expression and localization of the two tight junctions protein ZO-1 and occludin. As compared to control subjects, patients with PD had significant higher enteric GFAP expression levels whereas the phosphorylation at serine 13 was significantly lower. The para- and transcellular permeabilities were not different between PD patients and controls. The expression of occludin, but not ZO-1, was significantly lower in colonic samples from PD patients as compared to controls and the cellular distribution of both proteins was altered in PD patients. Our findings provides evidence that the NGEU is altered in PD via accumulation of α -synuclein in enteric neurons, enteric glial reaction and IEB morphological impairments. This PhD work further reinforce the potential role of the gastrointestinal tract in the initiation and/or the progression of the disease.

Key Words

Parkinson's disease, neuro-glio-epithelial unit, enteric nervous system, intestinal epithelial barrier, enteric glial cells, GFAP, tight junctions, occludin, ZO-1.