

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

CONTROLE DE LA SURVIE NEURONALE PAR LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES DANS DES CONDITIONS DE STRESS OXYDANT

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Biologie-Santé-Médecine

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Hind ABDO

Le 27 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Président du Jury

Dr François VALLETTE, Directeur de Recherche INSERM, INSERM U892, Université de Nantes

Rapporteurs

Pr Bruno BONAZ, PU-PH, INSERM U836, Université Grenoble 1

Dr Hervé CHNEIWEISS, Directeur de Recherche CNRS, INSERM U894, Université Paris V

Examineurs

Pr Roberto DE GIORGIO, Professeur de l'Université de Bologne, Italie

Dr François VALLETTE, Directeur de Recherche INSERM, INSERM U892, Université de Nantes

Directeurs de Thèse

Pr Pascal DERKINDEREN PU-PH, INSERM U913 Université de Nantes

Dr Bernard LARDEUX Chargé de recherche CNRS, INSERM U913 Université de Nantes

Contrôle de la survie neuronale par les cellules gliales entériques dans des conditions de stress oxydant

Résumé: Des phénomènes de neurodégénérescence du système nerveux entérique (SNE) ont été décrits au cours d'états inflammatoires intestinaux et chez des malades atteints de pathologies neurodégénératives centrales. Par ailleurs, des études récentes ont montré l'importance des cellules gliales entériques (CGE) dans le contrôle des fonctions neuronales. Néanmoins, le rôle neuroprotecteur potentiel de ces cellules reste très mal connu. Aussi, le but de ce travail de thèse était de mettre en évidence le contrôle de la survie neuronale par les CGE et d'identifier les mécanismes et les médiateurs impliqués. En utilisant une stratégie d'infection adénovirale, nous avons d'abord montré que la destruction spécifique des CGE présentes dans les cultures primaires induisait une dégénérescence des neurones entériques en conditions basales mais aussi lors d'un stress oxydant induit par la dopamine ou le peroxyde d'hydrogène. La co-culture de lignées de CGE avec les cultures primaires de SNE ou avec une lignée de neuroblastome humain permet une réduction de la mort apoptotique des neurones induite par le stress oxydant. L'ajout de milieu conditionné de CGE reproduit cet effet neuroprotecteur démontrant ainsi l'implication de facteur(s) soluble(s) dans la neuroprotection. Parmi les médiateurs impliqués, nous avons identifié le glutathion réduit (GSH), qui aurait une action directe sur le microenvironnement neuronal. L'implication du GSH a été démontrée en inhibant sa synthèse à la fois par des approches génétiques (ARN interférence) et pharmacologiques. Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'implication d'un autre médiateur, la 15d-PGJ₂, dérivée des oméga-6, qui permet une protection préventive et à long terme. L'implication de la 15d-PGJ₂ a été démontrée en bloquant la synthèse de cette molécule au sein des CGE par ARN interférence. Enfin, nous avons mis en évidence une neuroprotection par les cellules épithéliales intestinales qui sont présentes à proximité des neurones. En conclusion, nos travaux démontrent que les CGE possèdent des capacités neuroprotectrices dans le SNE lors d'un stress oxydant induit. La capacité neuroprotectrice des CGE, similaire à celle décrite pour les astrocytes du système nerveux central, pourrait être utilisée comme une cible thérapeutique au cours des neuropathies entériques.

Mots-clés : système nerveux entérique, cellules gliales entériques, stress oxydant, dopamine, peroxyde d'hydrogène, neurodégénérescence, neuroprotection, Caspase3, glutathion réduit, 15d-PGJ₂

دور الخلايا الصمغية المعوية في رعاية الخلايا العصبية وحمايتها أثناء تعرضها لعناصر و وضعيات مؤكسدة
تشير العديد من الدراسات إلى وجود ظواهر إنحلال الجهاز العصبي المعوي خلال الأمراض التي تصيب الجهاز الهضمي أو الأمراض التي تصيب الجهاز العصبي المركزي. وقد أثبتت بعض الأبحاث الدور الأساسي الذي تلعبه الخلايا الصمغية في تنظيم وظائف الخلايا العصبية. غير أن دور هذه الخلايا في حماية الخلايا العصبية و إنقاذها من الموت ما زال مجهولاً. تهدف هذه الدراسة بشكل رئيسي إلى معرفة أهمية هذه الخلايا في الحالات العادية (الفسيولوجية) وفي الحالات المرضية (الباثولوجية). تم إستعمال لهذه الدراسة استنباتات خلايا عصبية معوية وخلايا صمغية معوية أنتجت من أمعاء الجرذ الجينين. اثبتنا أولاً أن قتل الخلايا الصمغية الموجودة في هذا الاستنباط يقلل من مقاومة الخلايا العصبية وموتها بشكل أسرع.
بصورة خاصة، يؤدي وجود كميات كبيرة من العناصر المؤكسدة كالدوبامين أو الماء المهدرج (H₂O₂) إلى إنحلال الخلايا العصبية وهلاكها. في هذه الحالة، أظهرت هذه الدراسة أن إضافة الخلايا الصمغية إلى استنباتات الخلايا العصبية يمنع تأثير هذه العناصر السامة ويحمي الخلايا العصبية من الإنحلال والموت.
في المرحلة التالية تم إكتشاف عاملين محلولين يلعبان دوراً أساسياً في الدفاع عن الخلايا العصبية من تأثير العناصر السامة. الجلوتاثيون هو الجزيء الأول وهو ببتيد ثلاثي يلعب دوراً هاماً في حماية خلايا الجسد من التأكسد. و أظهرت دراستنا أن طريقة الحماية عبر هذا الجزيء هي طريقة سريعة ومباشرة تهدف إلى منع تأثير العناصر السامة في محيط الخلية العصبية. تم درس وإظهار وظيفة الجلوتاثيون من خلال إستخدام طرق فرمكولوجية و طرق التعديل الجيني.
أما العامل الآخر فهو البرستجلندين ج ٢ (ب ج ج ٢) وهو حمض دهني مشتق من الأوميغا-٦ ويلعب دوراً هاماً كمضاد للإتهابات. اثبتنا في هذه الدراسة أن هذا الجزيء له تأثير وقائي أساسي يحسن مقاومة الخلية العصبية ويزيد قدرتها على الدفاع في حال وجود العناصر المؤكسدة والسامة. وقد استخدمنا لإظهار هذا الدور تقنية الأحماض النووية المضادة. أخيراً تم إظهار في هذه الدراسة دور هام للخلايا الطلانية المعوية في حماية الخلايا العصبية من عدوان العناصر المؤكسدة. تبرز في هذا البحث أهمية الخلايا الصمغية المعوية في ضبط أحوال الجهاز العصبي المعوي بشكل عام ودور هذه الخلايا في حماية الخلايا العصبية من الموت بشكل خاص. تعتبر هذه الدراسة خطوة أساسية في مجال علم الأعصاب المعوية وقد تؤدي في المدى البعيد إلى إستخدام الخلايا الصمغية وخصائصها الحمائية لعلاج الأمراض المعوية والعصبية بشكل عام.
مفردات أساسية : الجهاز العصبي المعوي، الخلايا الصمغية المعوية، الدوبامين، الإنحلال العصبي، الجلوتاثيون، البرستجلاندن ج 2
هند عبده - معهد العلوم والأبحاث الطبية INSERM U913 - Nantes

Sommaire

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION GENERALE.....	5
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1 LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE.....	7
1.1 <i>Caractéristiques générales du système nerveux entérique.....</i>	7
1.2 <i>Découverte et mise en évidence du SNE.....</i>	8
1.3 <i>Ontogénèse du système nerveux entérique.....</i>	9
1.3.1 Colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale.....	9
1.3.2 Maturation des cellules du système nerveux entérique et développement de leurs fonctions.....	10
1.3.3 Contrôle génétique du développement du SNE.....	13
1.3.3.1 La voie de signalisation RET/GFR α 1/GDNF.....	13
1.3.3.2 La voie de signalisation EDNRB/ EDN-3.....	14
1.4 <i>Organisation du système nerveux entérique et ses différentes composantes.....</i>	14
1.5 <i>Les neurones entériques.....</i>	15
1.5.1 Classification des neurones entériques.....	15
1.5.1.1 Classification des neurones entériques basée sur leur morphologie.....	16
1.5.1.2 Classification des neurones entériques selon leurs propriétés électrophysiologiques.....	17
1.5.1.3 Classement des neurones entériques selon leurs groupes fonctionnels.....	18
1.5.2 Le codage neurochimique.....	23
1.5.3 Contrôle des fonctions gastro-intestinales par les neurones entériques.....	24
1.5.3.1 Contrôle de la motricité intestinale.....	24
1.5.3.2 Contrôle de la sécrétion intestinale.....	27
1.5.3.3 Contrôle des propriétés de la barrière épithéliale intestinale.....	30
1.6 <i>La cellule gliale entérique.....</i>	31
1.6.1 Les cellules gliales entériques : morphologie et marqueurs spécifiques.....	31
1.6.2 Développement des cellules gliales entériques.....	34
1.6.3 Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques.....	35
1.6.3.1 Interactions glie-neurones : contrôle des fonctions neuronales par les cellules gliales entériques.....	35
1.6.3.2 Interactions avec les cellules épithéliales intestinales.....	38
2 LE STRESS OXYDANT ET SON IMPLICATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES.....	40
2.1 <i>Systèmes oxydants: les espèces réactives de l'oxygène.....</i>	40
2.2 <i>Les systèmes de défense antioxydants.....</i>	42
2.2.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	42
2.2.1.1 Les superoxyde dismutases.....	43
2.2.1.2 Les catalases.....	43
2.2.1.3 Les glutathion peroxydases.....	43
2.2.2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	45
2.2.2.1 Les vitamines E et C.....	45
2.2.2.2 Le glutathion.....	46
2.2.2.3 Fonctions antioxydantes du glutathion.....	47
2.2.3 Régulation des systèmes antioxydants : rôle de Nrf2.....	49
2.3 <i>Stress oxydant et conséquences cellulaires.....</i>	52
2.3.1 Altération des différents constituants de la cellule.....	54
2.3.1.1 La peroxydation lipidique.....	54
2.3.1.2 Oxydation des protéines.....	55
2.3.1.3 Oxydation de l'ADN.....	55
2.3.2 Mort cellulaire induite par le stress oxydant.....	57

2.4	<i>Stress oxydant dans le SNC</i>	61
2.4.1	Stress oxydant et pathologies neurodégénératives	61
2.4.1.1	Origine et conséquences du stress oxydant dans les pathologies neurodégénératives .	62
2.4.1.2	Stress oxydant et maladie d'Alzheimer	63
2.4.1.3	Stress oxydant et maladie de Parkinson.....	64
2.4.1.4	Stress oxydant et sclérose latérale amyotrophique (SLA)	65
2.4.2	Neurodégénérescence et rôle des cellules gliales astrocytaires.....	66
2.4.2.1	Les cellules gliales astrocytaires ou astrocytes.....	66
2.4.2.2	Les astrocytes et le contrôle des fonctions neuronales	67
2.4.2.3	Le rôle neuroprotecteur des astrocytes	69
3	NEUROPATHIES DIGESTIVES ET ROLE DES CELLULES GLIALES ENTERIQUES	71
3.1	<i>Les neuropathies entériques</i>	71
3.2	<i>Implication du stress oxydant au cours des pathologies digestives</i>	72
3.2.1	Altération des fonctions neuronales par le stress oxydant.....	73
3.2.2	Neurodégénérescence induite par le stress oxydant.....	73
3.3	<i>Rôle des cellules gliales entériques</i>	74
3.3.1	Altération des cellules gliales au cours des pathologies digestives.....	74
3.3.2	Déplétion des cellules gliales entériques dans des modèles expérimentaux.....	76
3.3.3	Médiateurs gliaux et neuroprotection.....	79
3.3.4	La 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15d-PGJ2).....	80
3.3.4.1	Voies de synthèse de la 15d-PGJ2	80
3.3.4.2	Cibles et fonctions biologiques de la 15d-PGJ2	82
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	86
	RESULTATS	88
	ARTICLE 1 : LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES JOUENT UN ROLE NEUROPROTECTEUR LORS D'UN STRESS OXYDANT MEDIE EN PARTIE PAR LE GLUTATHION REDUIT	88
	ARTICLE 2 : NEUROPROTECTION PAR LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES : EFFETS A LONG TERME ET ROLE DE LA PROSTAGLANDINE 15D-PGJ2	92
	ARTICLE 3 : ROLE DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES DANS LE CONTROLE DES FONCTIONS DU SNE : REGULATION DU PHENOTYPE NEUROCHIMIQUE ET ROLE NEUROPROTECTEUR CONTRE UN STRESS OXYDANT	96
	DISCUSSION GENERALE	99
1	LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES : UN ACTEUR DE PREMIERE LIGNE DANS LE CONTROLE DES FONCTIONS NEURONALES.....	99
2	ATTEINTE DES CELLULES GLIALES ENTERIQUES AU COURS DES NEUROPATHIES ENTERIQUES : CONCEPT DE NEUROGLIOPATHIES.....	105
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	108
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110

Liste des abréviations

15d-PGJ2	15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandine J2	EDNR(B)	Endothelin receptor (type B)
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine	EGF	Endothelial growth factor
7-AAD	7-amino actinomycin D	EGFR	EGF receptor
ACh	Acétylcholine	ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ADP	Adénosine di-phosphate	FAK	Focal adhesion kinase
AGE	Advanced glycation end product	FGF	Fibroblast growth factor
AH	After hyperpolarization	GABA	Gamma amino butyric acid
AIF	Apoptosis inducing factor	GAT2	GABA transporter 2
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	GCL	Glutamate cystéine ligase sous-unité catalytique de la GCL
AP-1	Activator protein-1	GCLc	
APAF-2	Apoptosis protease activating factor-2	GCLm	sous-unité modulatrice de la GCL
APP	Amyloid precursor protein	GCV	Ganciclovir
ARE	Antioxydant response element	GDNF	Glial derived neurotrophic factor
ATP	Adénosine tri-phosphate	GFAP	Glial fibrillary acidic protein
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	GFRα1	GDNF family receptor alpha- 1
BEI	Barrière épithéliale intestinale	GLP-2	Glucagon-like peptide 2
BHE	Barrière hémato- encéphalique	GPx	Glutathion peroxydase
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2	GR	Glutathion reductase
CAT	Catalase	Grx	Glutarédoxine
CCK	Cholécystokinine	GS	Glutathion synthétase
CEI	Cellules épithéliales intestinales	GSH	Glutathion réduit
CGE	Cellules gliales entériques	GSNO	S-nitrosoglutathione
CGRP	Calcitonin-gene related peptide	GSSG	Glutathion oxide
ChAT	Choline acétyltransferase	GST	Glutathion S-transférase
CIC	Cellules interstitielles de Cajal	GSTA2	Glutathion-S-transférase A2
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
CNC	Cap n'collar	HHE	4-hydroxy-2-hexenal
CNFT	Ciliary neurotrophic factor	HNE	4-hydroxy-2-nonanal
CNTRα	CNTF receptor alpha	HSP-70	Heat shock protein-70
COX 1/2	Cyclooxygénase 1/2	HSV	Herpes simplex virus
DCC	Deleted in colorectal cancer	HSV-TK	Herpes simplex virus- thymidine kinase
ECE-1	Endothelin-Converting Enzyme-1	IL	Interleukine
EDN-3	Endothéline 3	IP	Iodure de propidium
		IPAN	Intrinsic primary afferent neuron
		Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
		LIF	Leukemia inhibitory factor
		LIFR-β	LIF receptor beta
		MC	Milieu conditionné
		MDA	Malonedialdehyde

MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	PHGPx	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase ou GPx4
MMC	Complexe de migration myoélectrique	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
MRP1	Multidrug resistance protein 1	PPSE	Potentiel post-synaptique excitateur
NA	Noradrénaline	Prx	Peroxyrédoxines
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)	RANTES	regulated on activation of normal T cell expressed and secreted; chémokine CCL5
NCC	Cellules de la crête neurale	RCH	Rectocolite hémorragique
NF 220 kDa	Neurofilaments de 220 kDa	RET	Récepteur tyrosine-kinase
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells		Rearranged during Transfection
NGF	Nerve growth factor	S	Synaptic (neurones de type S "synaptic")
NMDA	N-méthyl-D-aspartate	S-100β □	S-100 calcium-binding protein beta
NO	Nitric Oxide (monoxyde d'azote)	SN	Système nerveux
NOS	Nitric oxide synthase	SNC	Système nerveux central
NPY	Neuropeptide Y	SNE	Système nerveux entérique
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase	SOD	Superoxide dismutase
Nrf-2	Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2	SOM	Somatostatine
NRG	Neuregulin	SP	Substance P
NSE	Neuronal specific enolase	TD	Tube digestif
NT-3	Neurotrophine-3	TGF-β	Transforming growth factor beta
NTPDase 2	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	TK	Thymidine kinase
PA	Potentiel d'action	TNF	Tumor necrosis factor
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	Trx	Thiorédoxine
PARP	Poly(ADP-ribose)polymérase	TrxR	Thiorédoxine réductase
PEPT2	Peptide transporter 2	TTX	Térodotoxine
PG	Prostaglandine	VIP	Vasoactive intestinal peptide
PGDS	Prostaglandine D2 synthase	ZO-1	Zonula Occludens-1
PGP 9.5	Protein gene product 9.5	γ-GT	Gamma glutamyl transférase

Introduction générale

L'oxygène représente après l'azote l'élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il a été découvert en 1772-1774 par Lavoisier. Indispensable à la vie aérobie, il est utilisé par les mitochondries pour produire de l'énergie. Cependant une partie de l'oxygène (0,4 à 4%) n'est pas complètement convertie en énergie. Il en résulte une production de molécules oxygénées très réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui vont attaquer les différents constituants de la cellule. En conditions physiologiques, ces ERO sont rapidement éliminées par les systèmes de défense anti-oxydante de la cellule. Toutefois certaines situations sont associées à un excès de production d'ERO ou à un déficit dans les systèmes de défense : c'est l'état de stress oxydant.

Le cerveau utilise à lui seul 20% de l'oxygène de l'organisme alors qu'il ne représente que 2% du poids de l'organisme. Cette activité métabolique intense le rend particulièrement susceptible au stress oxydant. En effet, le stress oxydant est impliqué dans la génération et la progression d'un grand nombre de maladies neurologiques, en particulier les pathologies neurodégénératives.

Un « deuxième cerveau » plus primitif se trouve au niveau du tube digestif. Composé de ganglions organisés en plexus, ce réseau est retrouvé tout le long du tube digestif, de l'œsophage jusqu'au rectum. Il contrôle ainsi les différentes fonctions du tube digestif. La neuro-gastroentérologie, science qui s'est développée au cours des trente dernières années, est basée sur l'étude du contrôle nerveux des fonctions digestives. Le système nerveux entérique comprend deux populations cellulaires majeures : les neurones entériques et les cellules gliales entériques (CGE).

De nombreuses pathologies digestives sont associées à une atteinte du SNE. Les réponses inflammatoires et/ou immunitaires impliquent ainsi une production

très élevée d'H₂O₂ et de radicaux libres qui vont attaquer les cellules avoisinantes, notamment les cellules du SNE, ce qui se traduit par un processus de neurodégénérescence.

Mises en évidence en 1899, les CGE ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien du tissu nerveux. Ce n'est que dernièrement que différents laboratoires ont commencé à s'intéresser à cette population. Par analogie avec les astrocytes du système nerveux central, les cellules gliales seraient impliquées dans le contrôle des fonctions neuronales, notamment le contrôle du phénotype neurochimique et de la survie neuronale. Cependant, le rôle que jouent les cellules gliales entériques dans le contrôle de la survie neuronale est très peu connu.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser le rôle des cellules gliales entériques dans le contrôle de la survie neuronale, en conditions de base et en réponse à un stress oxydant induit par la dopamine et le peroxyde d'hydrogène.

Cette thèse est structurée autour de trois articles : un publié, un deuxième en révision et un troisième en préparation. Ces articles sont précédés d'une étude bibliographique qui sera composée des thèmes suivants :

- le système nerveux entérique et ses différentes fonctions ;
- les populations cellulaires majoritaires du système nerveux entérique, neurones entériques et cellules gliales, et leurs fonctions respectives ;
- le stress oxydant et ses conséquences au niveau du système nerveux central ;
- la population gliale du système nerveux central (SNC) et son implication dans la neurodégénérescence ;
- les neuropathies entériques et l'atteinte gliale au cours de ces neuropathies.

Etude bibliographique

1 Le système nerveux entérique

1.1 Caractéristiques générales du système nerveux entérique

Le terme de système nerveux entérique (SNE) désigne un ensemble de réseaux neuronaux qui s'étend tout le long du tube digestif (TD), de l'œsophage au rectum. D'abord considéré comme un simple relai post-ganglionnaire faisant partie du système nerveux parasympathique, des études menées à la fin du 19^{ème} siècle ont mis en évidence le caractère autonome du SNE vis-à-vis du système nerveux central, le considérant comme une entité à part. Cette définition plus ou moins radicale a été émise pour la première fois en 1905 (Langley and Magnus 1905). Il a fallu attendre ensuite plusieurs décennies pour voir émerger cette nouvelle science qu'est la neuro-gastroentérologie.

L'exploration histologique de la paroi intestinale permet d'identifier un réseau nerveux extrêmement complexe innervant les muscles, l'épithélium et les vaisseaux sanguins. Le SNE est constitué de 100 millions de neurones, ce qui équivaut au nombre de neurones dans la moelle épinière (Goyal and Hirano 1996). Ces neurones sont groupés en ganglions organisés en deux réseaux majeurs qu'on appelle plexus ; le premier est situé entre les couches musculaires circulaires et longitudinales (plexus myentérique ou d'Auerbach) ; le second se trouve dans la couche sous-muqueuse (plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner) (Figure 1).

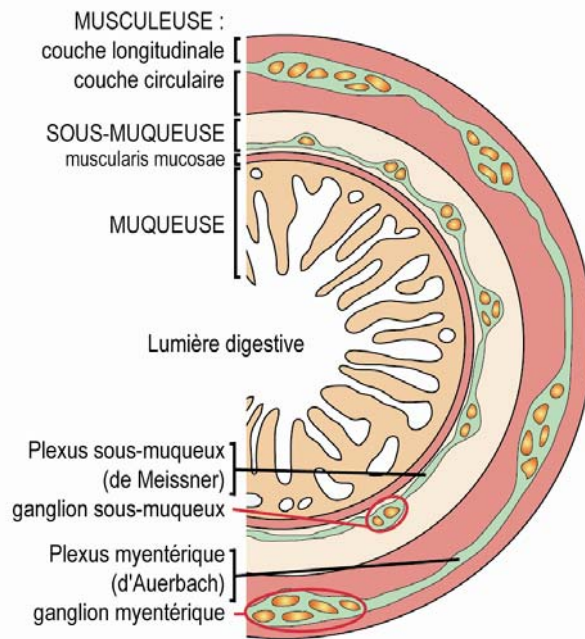


Figure 1 : Représentation schématique d'une ½ coupe transversale de l'intestin.

Le système nerveux entérique est constitué de ganglions organisés en deux plexus principaux : le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach situé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale ; et le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner situé à proximité de la muqueuse (INSERM U913).

1.2 Découverte et mise en évidence du SNE

L'étude des structures neuronales digestives a commencé au cours du 19^{ème} siècle. Les plexus sous-muqueux et myentérique ont été identifiés en 1857 par G. Meissner et en 1864 par L. Auerbach (Meissner 1857; Auerbach 1864; Timmermans et al. 1997). Ensuite, les expériences réalisées par Ramón y Cajal ont permis de montrer l'existence de différents types de neurones au sein de l'intestin (Cajal 1893). En 1899, l'histologiste russe A. S. Dogiel a établi une classification des différents types de neurones entériques en se basant sur leur morphologie (Dogiel 1899).

Cependant, les premiers travaux sur les fonctions du SNE ont été réalisés par Bayliss et Starling sur l'intestin grêle en 1899 puis sur le côlon de chien en 1900. Ils ont montré que l'intestin isolé et dénervé présentait des contractions polarisées

(contraction du côté oral et une relaxation du côté anal) en réponse à des stimulations mécaniques ou de façon spontanée. Ils définissent ainsi la « loi de l'intestin » et identifient le plexus d'Auerbach comme responsable du contrôle du réflexe péristaltique (Bayliss and Starling 1899; Bayliss and Starling 1900).

Leurs travaux ont été complétés par J. N. Langley qui montra que cette contraction persistait après dégénérescence des afférences nerveuses, prouvant le caractère intrinsèque de ce réflexe (Langley and Magnus 1905).

1.3 Ontogénèse du système nerveux entérique

1.3.1 Colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale

Les premières études sur le développement embryonnaire du SNE ont été menées par Kuntz en 1910 (Kuntz 1910). En étudiant les précurseurs des ganglions sympathiques des plexus cardiaques et gastro-intestinaux, il a observé que les précurseurs des cellules du SNE proviennent du segment vagal de la crête neurale. Son hypothèse a été confirmée plusieurs années plus tard par Jones en 1942 puis par Yntema et Hammond en 1954 (Jones 1942; Yntema and Hammond 1954).

Les différentes composantes du SNE proviennent des cellules de la crête neurale (NCC) qui migrent à partir des segments vagal, sacré et rostro-troncal du neurectoderme (Burns and Le Douarin 2001; Newgreen and Young 2002). La majorité des cellules du SNE dérivent du segment vagal (somites 1- 7). Les NCC du segment sacré vont coloniser uniquement la partie post-ombilicale du tube digestif et les NCC du segment rostro-troncal vont quant à elles coloniser la partie antérieure du TD (œsophage et estomac supérieur) (Gershon 1997).

Les NCC du segment vagal pénètrent dans la partie antérieure du tube digestif au 9^{ème} jour embryonnaire (stade E9.5) chez la souris et à la 4^{ème} semaine de gestation chez l'homme. Ces cellules vont migrer dans le sens rostro-caudal et coloniser de façon séquentielle les différentes régions du TD en commençant par la partie antérieure. La colonisation du TD s'achève au 15^{ème} jour de gestation chez la

souris et à la 7^{ème} semaine chez l'homme (Heanue and Pachnis 2007). Les NCC situées derrière le front de migration sont initialement distribuées de façon aléatoire ; elles se réunissent ensuite pour former des ganglions selon un axe de maturation rostro-caudal (Fu et al. 2004; Wallace and Burns 2005) (Figures 2 et 3).

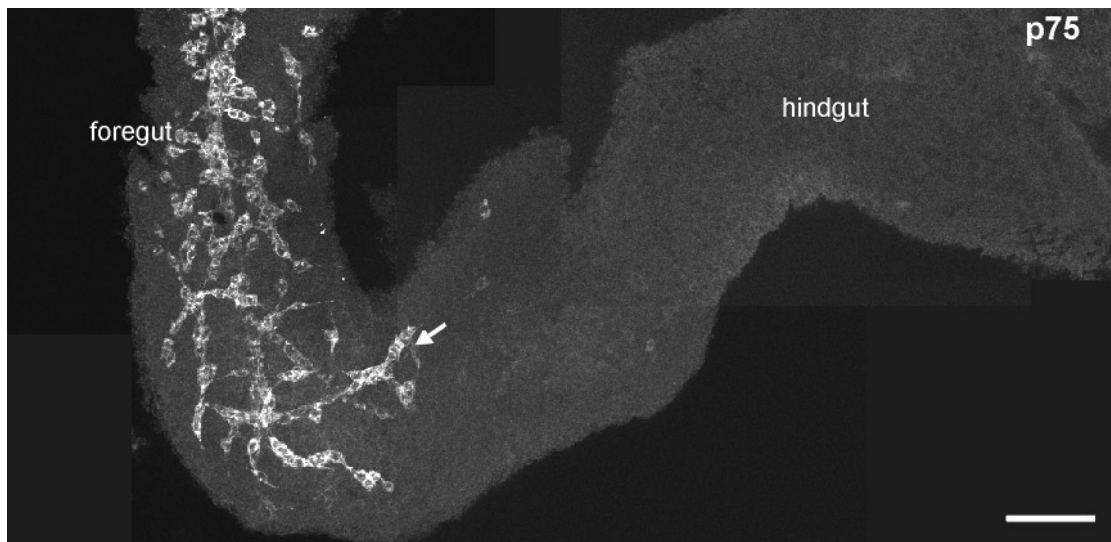


Figure 2 : Le système nerveux entérique au cours du développement.

Préparation d'intestin d'embryon de souris au stade E10. Le marquage immunohistologique du facteur de transcription p75 montre les cellules dérivées de la crête neurale en cours de migration. A ce stade, l'intestin antérieur (foregut) est entièrement colonisé, le front de migration (flèche) est localisé dans la partie médiane mais on n'observe aucune cellule immunoréactive dans la partie postérieure (hindgut) ; échelle, 100 μ m. (Young et al. 1998).

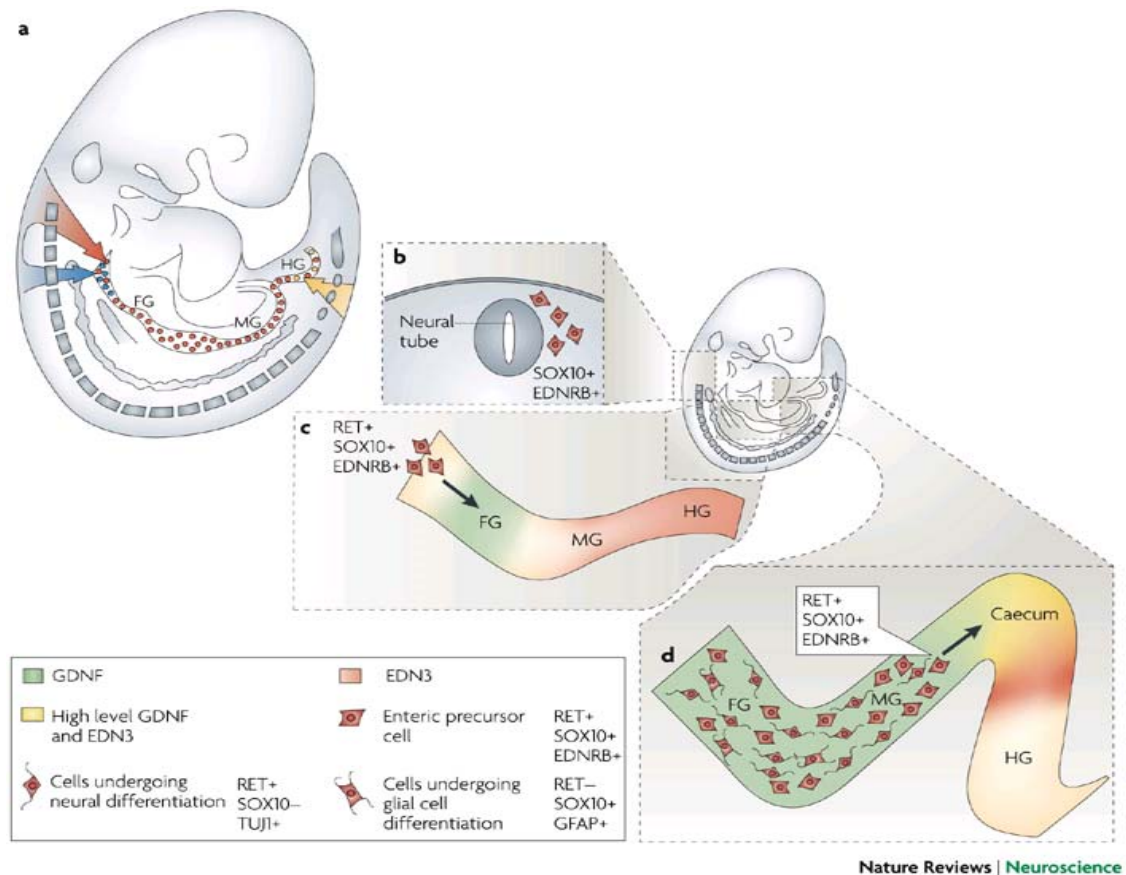
1.3.2 Maturation des cellules du système nerveux entérique et développement de leurs fonctions

Le développement des fonctions du SNE débute au cours de la vie foetale et se poursuit après la naissance. La formation du plexus sous-muqueux a lieu deux à trois jours après le plexus myentérique chez la souris et deux à trois semaines chez l'homme. On suppose que les cellules du plexus sous-muqueux dérivent du plexus myentérique (Wallace and Burns 2005). Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement dans une étude montrant que les cellules neurales

progénitrices migrent du plexus myentérique vers la sous-muqueuse sous l'influence des Nétrines et leurs récepteurs DCC (Deleted in colorectal cancer) (Jiang et al. 2003).

Quand les cellules dérivées des crêtes neurales commencent à coloniser le TD, elles se différencient en cellules gliales ou en différents types de neurones (Young et al. 2003). Tous les neurones entériques expriment certaines protéines qui sont utilisées comme marqueurs généraux des neurones entériques, parmi lesquelles les neurofilaments (NF220), les protéines Hu C/D, la β -Tubuline III et PGP9.5.

La génération des différents types de neurones entériques est contrôlée par un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui permettent de diriger et de coordonner la destinée des cellules neurales entériques. Les seuls facteurs intrinsèques qui ont été mis en évidence sont les facteurs de transcription Mash-1 et Sox-10. Mash-1 est impliqué dans le développement des neurones sérotonergiques (Blaugrund et al. 1996) et Sox-10 est essentiel à la différenciation des cellules gliales entériques (Kelsh 2006). Différents types de molécules sont produits par le mésenchyme intestinal comme le GDNF (Glial derived neurotrophic factor), l'EDN-3 (endothéline-3) et le BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) et jouent un rôle majeur dans la différenciation des cellules progénitrices.



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 3 : Ontogenèse du système nerveux entérique : colonisation du tube digestif par les cellules de crête neurale, leur migration et contrôle génétique

(a) Au stade E8.5- 9 chez l'embryon de souris, les cellules de la crête neurale (NCC) du segment vagal (flèche rouge) pénètrent dans la partie supérieure du tube digestif (TD) et migrent dans le sens rostro-caudal afin de coloniser de façon séquentielle la partie antérieure (FG), la partie médiane (MG) et la partie postérieure (HG) (pointillés rouges). Les NCC de la partie la plus caudale du segment vagal proviennent d'une région qui se superpose avec les NCC de la partie du segment rostro-troncal la plus antérieure (flèche bleue). Ces cellules participent à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac. Les NCC du segment sacré (flèche jaune) commencent leur migration plus tardivement (E13,5) dans le sens caudo-rostral pour coloniser le colon.

(b) Les NCC d'origine vagale expriment Sox-10 et EDNRB lorsqu'elles émigrent du tube neural.

(c) Vers le 9^e jour, les cellules dérivées des NCC expriment le récepteur RET. Dans le mésenchyme intestinal, son ligand GDNF est fortement exprimé dans l'estomac (vert) et le ligand de l'EDNRB EDN3 est exprimé dans les parties médiane et postérieure du TD (rose).

(d) Au stade E11, les cellules dérivées des NCC rencontrent de hauts niveaux d'expression de GDNF et d'EDN3 dans le caecum (high level GDNF and EDN3) (jaune). Les cellules en aval du front de migration commencent progressivement à se différencier (cells undergoing neural/ glial cell differentiation). GDNF et EDN3 sont ensuite exprimés dans la partie distale du TD postérieur (E 11.5, non illustrée). D'après (Heanue and Pachnis 2007).

1.3.3 Contrôle génétique du développement du SNE

La migration des cellules progénitrices dans le TD, leur maturation et leur différenciation sont contrôlées et dirigées par une série de signaux et de voies de signalisations activés ou inhibés en fonction du stade de développement. L'ensemble des processus conduisant à la formation et à la maturation du SNE est contrôlé par deux voies de signalisation majeures : la voie RET/GFR α 1/GDNF et la voie EDNRB/ EDN-3 (Barlow et al. 2003) (Figure 3). De plus, des mutations dans les gènes codant pour le GDNF, RET, l'EDN-3, EDNRB et ECE-1 ont été identifiées chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung, pathologie digestive caractérisée par une absence de ganglions entériques (aganglionose) dans le côlon distal (Heanue and Pachnis 2007).

1.3.3.1 La voie de signalisation RET/GFR α 1/GDNF

Le récepteur à activité tyrosine kinase (RET) est activé par son ligand le GDNF via le corécepteur GFR α 1. Le récepteur RET est exprimé par les cellules progénitrices alors que le ligand GDNF est produit par le mésenchyme du TD en cours de développement. Le corécepteur GFR α 1 est exprimé à la fois par les cellules progénitrices et par les cellules du mésenchyme (Newgreen and Young 2002). Le facteur GDNF joue un rôle clef dans le développement du SNE, notamment dans la survie et la prolifération des précurseurs et dans leur différenciation. Il a été montré que lors du développement, le GDNF est exprimé par les cellules du mésenchyme du tube digestif selon un gradient de concentration rostro-caudal en amont du front de migration des cellules de la crête neurale. En effet, le GDNF pourrait avoir des effets chémoattractifs permettant de guider les cellules précurseurs lors de leur migration (Young et al. 2001; Natarajan et al. 2002). Par ailleurs, une absence de ganglions entériques est observée à partir de l'estomac dans les animaux transgéniques mutés pour les gènes *ret*, *gdnf* ou *gfr α 1* (Moore et al. 1996; Pichel et al. 1996; Cacalano et al. 1998).

1.3.3.2 La voie de signalisation EDNRB/ EDN-3

L'endothéline-3 (EDN-3) est membre d'une famille de peptides sécrétés qui sont les ligands des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G EDNR (Endothelin receptor). L'EDN-3, son récepteur EDNRB et l'enzyme responsable de l'activation de l'EDN-3, ECE-1 (Endothelin-Converting Enzyme-1) jouent également un rôle clef dans le développement du SNE (Heanue and Pachnis 2007). Tout comme le GDNF, l'EDN-3 est produite par les cellules mésenchymateuses du TD. Aux cours des stades précoces, son expression est diffuse dans les parties antérieure et médiane du TD puis elle devient restreinte au côlon proximal et au cæcum aux stades tardifs de développement (Barlow et al. 2003). La voie EDN-3 serait donc impliquée dans le contrôle de la migration des NCC (Heanue and Pachnis 2007). De fait, une aganglionose distale est observée suite à des mutations du gène *Ednrb* mais aussi en présence d'antagonistes du récepteur EDNRB (Sidebotham et al. 2002). La voie EDN-3 peut aussi avoir un rôle dans le maintien du pouvoir mitogène des NCC en inhibant leur différenciation. En effet, le nombre NCC est diminué chez des souris ayant une mutation du gène *edn-3* (Bondurand et al. 2006) et leur différenciation est inhibée par la présence de l'EDN-3 (Wu et al. 1999; Nagy and Goldstein 2006).

1.4 Organisation du système nerveux entérique et ses différentes composantes

Le système nerveux entérique est organisé en deux plexus majeurs (plexus myentérique ou d'Auerbach et plexus sous-muqueux ou de Meissner) (Meissner 1857; Auerbach 1864) ainsi que plusieurs plexus aganglionnaires présents dans les différentes couches de la paroi digestive. Le plexus myentérique est situé entre la couche musculaire longitudinale externe et la couche musculaire circulaire interne dans toutes les parties du tractus digestif. Le plexus sous-muqueux est localisé dans la couche sous-muqueuse et il est présent uniquement dans la paroi de l'intestin et sous une forme moins développée dans l'estomac (Anlauf et al. 2003). Chez les grands mammifères le plexus sous-muqueux regroupe plusieurs réseaux situés sur

plusieurs couches : un réseau interne localisé du côté séreux de la *muscularis mucosae* (plexus de Meissner) et un plexus externe proche du côté luminal de la couche musculaire circulaire (plexus de Schabadasch) (Schabadasch 1930). Un troisième plexus a été identifié chez l'homme, situé entre les deux premiers. D'autres plexus dépourvus de structures ganglionnaires sont retrouvés dans les différentes couches de la paroi digestive (Timmermans et al. 1992; Costa et al. 2000; Furness 2000; Furness et al. 2000; Kunze et al. 2000; Lomax and Furness 2000).

Chez l'homme, 100 millions de neurones environ composent le SNE sachant que la densité neuronale dans le plexus myentérique est supérieure à celle du plexus sous-muqueux (Wood et al. 1999). Des proportions différentes de ces populations neuronales sont activées durant les activités réflexes (Kunze and Furness 1999; Costa et al. 2000).

1.5 Les neurones entériques

1.5.1 Classification des neurones entériques

Les neurones du SNE ont été classés en se basant sur différents critères comme leur morphologie, leurs caractéristiques électrophysiologiques, leurs propriétés pharmacologiques ou encore les connections qu'ils établissent avec les autres neurones, les cellules musculaires et les cellules épithéliales. Tous ces paramètres peuvent varier d'une espèce à l'autre et d'une région à l'autre du tube digestif. Une avancée majeure de ces 20 dernières années fut l'établissement de liaisons entre la plupart de ces critères de classement (Lomax et al. 1999). Tous les types de neurones ont été caractérisés chez le cobaye, où ont été effectuées la plupart des études et des classifications du SNE. Les autres mammifères présentent une organisation et un fonctionnement assez similaires. Il existe néanmoins des différences de morphologie neuronale et de phénotype entre les différentes espèces. Par exemple, les ramifications dendritiques sont plus nombreuses et plus

élaborées chez les grands mammifères (homme, porc) que chez les mammifères de petite taille (souris, cobaye) (Purves and Lichtman 1985; Purves et al. 1986).

1.5.1.1 Classification des neurones entériques basée sur leur morphologie

La première classification des neurones entériques est basée sur leur morphologie. Cette classification a été initiée il y a plus d'un siècle par Dogiel qui a établi une description des différentes formes de neurones entériques dans les plexus myentériques et sous-muqueux chez l'homme, le cobaye, le lapin, le rat, le chien et le chat (Dogiel 1899). Il a décrit 3 types de neurones appelés Dogiel I, II et III. Les études effectuées plus tard dans les années 80 ont permis de classer les neurones selon les types I à VII (Brehmer et al. 1999). La majorité des neurones entériques appartiennent aux types I, II et III (Figure 4).

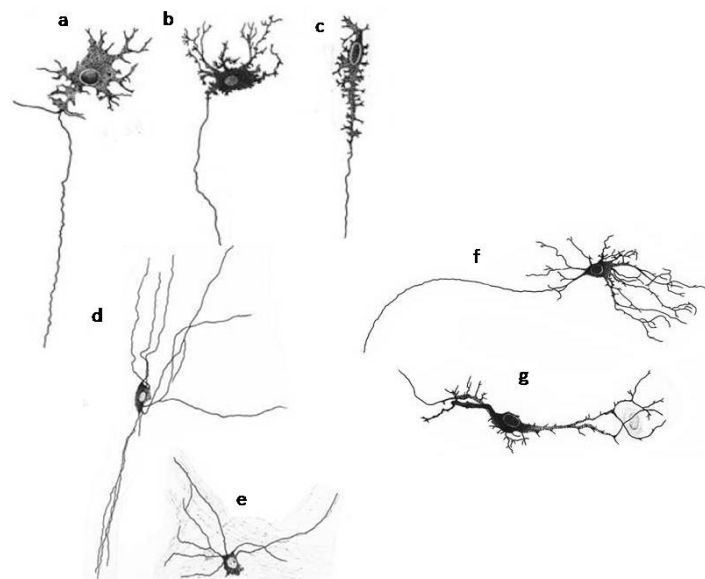


Figure 4 : Types morphologiques principaux de neurones entériques retrouvés dans l'intestin grêle chez le cobaye selon la classification de Dogiel.

(a-c) Neurones de type Dogiel I uniaxonaux avec plusieurs dendrites courtes. (d-e) neurones de type Dogiel II pluriaxonaux. (f-g) neurones de type Dogiel III uniaxonaux ayant plusieurs longues dendrites. D'après Furness 2006, The enteric nervous system (Blackwell publishing).

Les neurones de type Dogiel I sont caractérisés par une forme aplatie légèrement allongée et présentent un seul axone et plusieurs dendrites courtes et lamellaires. Ce groupe est relativement vaste ; il est donc impossible de déterminer un rôle fonctionnel précis à ce groupe de neurones. Les neurones de type Dogiel II sont multiaxonaux et se caractérisent par un corps cellulaire rond ou ovale de taille assez large. Ils peuvent avoir une forme adendritique ou dendritique (Brehmer et al. 1999). Ces neurones se caractérisent également par la présence d'un nombre important de mitochondries et de lysosomes observés en microscopie électronique (Pompolo and Furness 1988). Les neurones de type III sont uniaxonaux avec des dendrites très longues (Stach 1982).

1.5.1.2 Classification des neurones entériques selon leurs propriétés électrophysiologiques

La deuxième classification des neurones entériques est basée sur leurs caractéristiques électrophysiologiques (Lomax et al. 2001). Les premiers enregistrements intracellulaires permettant la description des propriétés électriques des neurones entériques ont été reportés dans les années 70 (Nishi and North 1973; Hirst et al. 1974; Wood and Mayer 1978). Ces premières études ont décrit trois types de neurones entériques ; le troisième type était non excitable et correspondait aux cellules gliales. Les neurones entériques ont été donc classés en deux catégories, les neurones de type S ou "synaptic" et les neurones de types AH ou "After Hyperpolarisation" dans l'intestin de cobaye (Hirst et al. 1974). Cette classification est toujours utilisée même si les appellations S et AH ne sont plus justifiables. Il a été ensuite montré que les neurones de type S présentent une morphologie de type Dogiel I (uniaxonal) et les neurones de types AH correspondent au type Dogiel II (multiaxonal).

Les neurones de type S présentent des potentiels d'action (PA) brefs suivis d'un potentiel d'hyperpolarisation de courte durée allant de 20 à 100 ms. Ces PA sont bloqués par la tétrodothoxine (TTX). Les neurones de type S peuvent avoir des morphologies assez variées mais ne sont jamais de type Dogiel II. Ils présentent un

potentiel excitateur post synaptique (PPSE) rapide et la composante PPSE est assez élevée pour générer un PA. Les données concernant cette population neuronale restent incomplètes.

Les neurones AH se caractérisent par un large potentiel d'hyperpolarisation suivant le PA. Ces neurones ne présentent pas de PPSE chez le cobaye. Les seuls PPSE enregistrés sont des PPSE lents insuffisants pour la génération d'un PA (Wood and Mayer 1978). Les PA des neurones AH sont assez larges (amplitude 75 à 110 mV) et d'une durée supérieure à celle des PA des neurones S. Ils présentent une inflexion dans la phase descendante de repolarisation et sont normalement suivis de deux phases séparées d'hyperpolarisation (AH), une première phase précoce et une seconde phase d'hyperpolarisation plus tardive (Hirst et al. 1974).

1.5.1.3 Classement des neurones entériques selon leurs groupes fonctionnels

Les neurones entériques ont été également classés selon leurs fonctions physiologiques présumées en se basant sur leur implication dans l'activité réflexe entérique, leurs formes et leurs projections ainsi que sur l'expression des différents neurotransmetteurs et de leurs récepteurs. Les études effectuées sur le cobaye ont permis d'établir une définition des différentes catégories de neurones dans l'intestin grêle (Furness 2000), dans le côlon (Lomax and Furness 2000) et dans l'estomac (Schemann et al. 1995; Reiche et al. 1998) (Figure 5, tableau I).

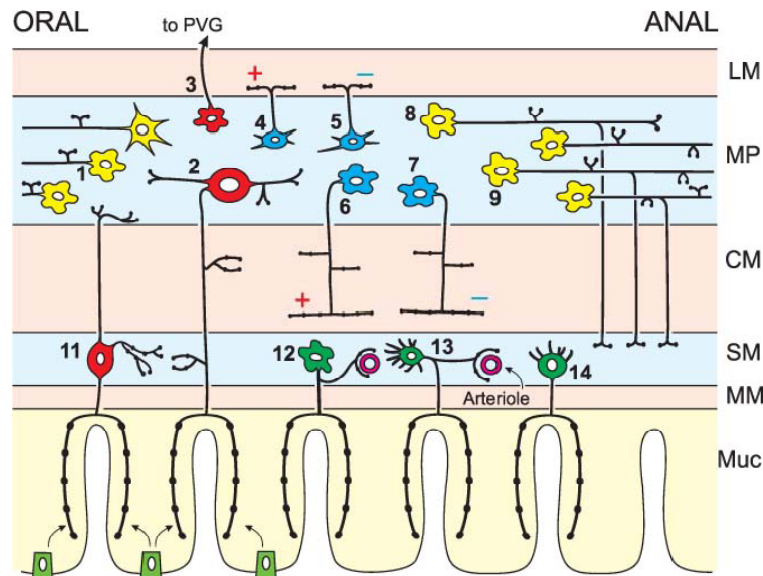


Figure 5: Classement des neurones entériques selon leurs propriétés fonctionnelles

Schéma représentant les différents types de neurones dans l'intestin grêle de cobaye, classés selon leurs fonctions, leur morphologie et leur codage neurochimique. Les neurones primaires afférents intrinsèques (IPAN) myentériques (2) et sous-muqueux (11) sont en rouge, de même qu'un neurone afférent intestinofuge (3). Les interneurones ascendants (1) et descendants (8 et 9) sont en jaune. Les motoneurones inhibiteurs (5 et 7) et excitateurs (4 et 6) en bleu. Les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs non cholinergiques (12) et cholinergiques (13) et les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs (14) sont en vert.

Abréviations : LM : muscle longitudinal ; MP : plexus myentérique ; CM : muscle circulaire ; SM : plexus sous-muqueux ; MM : Musculeuse muqueuse ; Muc : Muqueuse

Type de neurones	Neurotransmetteurs
IPAN	ACh, Calb, CGRP, SP
Interneurones ascendants	ACh, Calret, ENK, SP
Interneurones descendants	5-HT, ACh, DYN, GRP, NO, SOM, VIP
Neurones moteurs excitateurs	ACh, Calret, ENK, SP
Neurones moteurs inhibiteurs	DYN, ENK, GRP, NO, VIP
Neurones sécrétomoteurs	ACh, CCK, CGRP, DYN, NPY, SOM, VIP

Tableau I. Types de neurones dans le système nerveux entérique

Les différents types de neurones retrouvés dans l'intestin grêle de cobaye ainsi que les principaux neuromédiateurs produits (codage neurochimique). D'après Hansen et al, 2003.

Abréviations : 5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine) ; ACh : Acétylcholine ; Calb : calbindine ; Calret : calrétinine ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; DYN : dynorphine ; ENK : enképhalines ; GRP : gastrin releasing peptide ; IPAN : intrinsic primary afferent neurons ; NO : nitric oxide ; SOM : somatostatine ; SP : substance P ; NPY : neuropeptide Y ; VIP : vasoactive intestinal peptide.

1.5.1.3.1 Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs)

La détection de l'état du TD est gérée par trois types cellulaires : les cellules entéro-endocrines, les cellules immunitaires et les IPANs (Intrinsic Primary Afferent Neurons). Ces trois populations cellulaires jouent un rôle crucial dans le contrôle et la régulation de l'état fonctionnel du tube digestif et de ses réponses aux différents stimuli chimiques et mécaniques. En effet, le système endocrine gastro-hépatointestinal contient des milliers de cellules endocrines et une grande partie de ces cellules réagit avec l'environnement local en libérant de nombreuses molécules, dont une vingtaine sont des hormones. Par ailleurs, le système immunitaire intestinal responsable de la détection des immunogènes contient environ 70-80% des cellules immunitaires de l'organisme. Enfin les IPANs représentent 20% des neurones entériques sans compter les prolongements neuronaux (50000 prolongements environ) qui arrivent dans le tube digestif à travers le nerf vague et le nerf splanchnique (Furness et al. 1998). Des interactions intenses sont établies entre ces trois systèmes et permettent de réguler les réponses physiologiques de l'intestin aux différents stimuli.

Les neurones afférents peuvent avoir deux origines bien distinctes. On distingue ainsi les neurones afférents intrinsèques qui ont leurs corps cellulaires, leurs prolongements et leurs synapses dans le tube digestif, et les neurones d'origine extrinsèque dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions jugulaires et nodaux (afférents vagues) ou dans les ganglions de la racine dorsale (afférents spinaux) (Furness et al. 1998).

Les voies intrinsèques qui contrôlent les fonctions physiologiques de l'intestin comme le flux sanguin, la motricité intestinale et la sécrétion sont activées par les neurones intrinsèques qui répondent à différents stimuli comme la distension ou d'autres stimulations mécaniques ou chimiques de la muqueuse. Ces neurones qui détectent l'état de l'intestin représentent les premiers neurones dans les voies réflexes intestinales intrinsèques, d'où vient leur appellation de neurones afférents primaires intrinsèques ou IPANs (Kirchgessner and Gershon 1988).

Les IPANs sont maintenant définis comme des neurones AH avec une morphologie de type Dogiel II dans l'intestin grêle de cobaye (figure 5), avec des neurones analogues dans les autres organes et chez les autres espèces (Bornstein et al. 1994; Furness et al. 1998).

La principale fonction des IPANs consiste à transduire et codifier les informations concernant l'environnement chimique et l'état physique des tissus qu'ils innervent. Ils transmettent ces informations au circuit intégratif à travers lequel l'état fonctionnel de l'organe peut être modifié. L'intégrité de cette fonction sous-entend une réponse adéquate et proportionnée de ces neurones aux différents stimuli afin de reproduire leur intensité, leur durée et leurs propriétés.

L'activité des IPANs a pu être enregistrée grâce à l'utilisation d'électrodes intracellulaires et de marqueurs reflétant l'activité neuronale. Ces études montrent ainsi que les IPANs peuvent répondre à une distorsion mécanique de la muqueuse ou à une distension directe de leurs prolongements axonaux dans le plexus myentérique ou encore à l'application de substances chimiques au niveau de la muqueuse (Kirchgessner and Gershon 1988). Les IPANs peuvent aussi jouer le rôle de nocicepteurs puisque leur activation par des stimuli nocifs déclenche des réponses protectrices.

L'excitation des neurones afférents par des stimulations mécaniques ou chimiques est médiée en partie par les cellules entérochromaffines présentes dans la muqueuse via la sécrétion de sérotonine (5-HT). L'activation des IPANs peut aussi impliquer d'autres types de cellules entéroendocrines présentes dans la muqueuse et produisant d'autres types d'hormones comme la cholécystokinine (CCK) ou la motiline (Ahlman and Nilsson 2001). Ainsi les IPANs sont à la fois mécanosensibles et chimiosensibles.

1.5.1.3.2 Les interneurones

Des interneurones ont été identifiés dans toutes les régions du TD. Ils peuvent varier entre ces différentes régions plus que les autres types de neurones (figure 5; Tableau I). Dans le plexus myentérique, les interneurones forment des chaînes qui s'étendent dans le sens anal ou oral (Pompolo and Furness 1993). On distingue trois types d'interneurones descendants et un type d'interneurones ascendants dans l'intestin grêle de cobaye.

Les réflexes locaux de motricité impliquent deux types d'interneurones descendants exprimant l'acétylcholine (ACh) et la sérotonine (5-HT) ainsi que les interneurones ascendants (Furness 2000). Le 3^{ème} type d'interneurones descendants exprimant l'ACh et la somatostatine (SOM) est plutôt impliqué dans la propagation du complexe de migration myoélectrique (MMC) (Pompolo and Furness 1998). Ces sont des neurones de type Dogiel III avec de nombreuses dendrites ramifiées et filamenteuses (Portbury et al. 1995). Les MMC sont des ondes d'activité excitatrice qui se propagent dans le sens anal tout au long du tube digestif et qui sont médiées par des voies neuronales intrinsèques dans l'intestin. Les interneurones ACh/5-HT peuvent être impliqués dans des réflexes de motricité et sécrétomoteurs. Chacun de ces trois types d'interneurones innervent aussi les ganglions sous-muqueux.

1.5.1.3.3 Les neurones moteurs

On distingue cinq types de neurones moteurs : les neurones excitateurs du muscle, les neurones inhibiteurs du muscle, les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac qui ne seront pas évoqués (Furness et al. 2000) (figure 5).

Les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs innervent les muscles circulaires et longitudinaux ainsi que la *muscularis mucosæ* tout au long du tube digestif (Figure 5, Tableau I). Ce sont des neurones uni-axonaux de type S. Les neurotransmetteurs primaires des neurones excitateurs sont l'ACh et les

tachykinines alors que les neurones inhibiteurs produisent différents neurotransmetteurs comme le monoxyde d'azote (NO), le vasoactive intestinal peptide (VIP) et l'ATP qui peuvent être libérés par le même neurone (Furness 2000).

Les neurones sécrétomoteurs innervent la muqueuse intestinale et régulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. Certains innervent à la fois la muqueuse et les artérioles présentes dans la paroi digestive (neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs) ce qui leur permet de réguler à la fois les fonctions de sécrétion et de vasodilatation. En effet, la sécrétion exocrine des fluides par les glandes salivaires, le pancréas, etc. repose sur l'apport d'eau et d'électrolytes des vaisseaux. Elle est donc couplée à la vasodilatation. Ce couplage s'applique aussi au niveau de l'intestin. Ainsi la sécrétion et la vasodilatation sont régulées en parallèle. Les transports d'eau et d'électrolytes à travers la muqueuse peuvent être étudiés sur des couches de muqueuse isolée ou avec le tissu associé en chambre d'Ussing, indépendamment du flux sanguin. Hubel (1978) fut le premier à stimuler électriquement les nerfs de la muqueuse isolée. Il a ainsi montré que l'activation des nerfs de la muqueuse génère un courant ionique à travers la muqueuse d'intestin grêle chez le lapin. L'analyse de ces courants montre qu'ils sont dus à une sécrétion active d'ions chlorure, accompagnée par une sécrétion d'eau et d'ions sodium. Ces réponses sécrétoires sont bloquées par la TTX (Hubel 1978). Les neurones sécrétomoteurs et sécrétomoteurs/vasodilatateurs peuvent être divisés en trois groupes (Furness et al. 2003) : les neurones sécrétomoteurs/dilatateurs non cholinergiques co-exprimant le VIP, les neurones sécrétomoteurs/dilatateurs cholinergiques co-exprimant la calrétinine et les neurones cholinergiques co-exprimant le neuropeptide Y (NPY), qui sont uniquement sécrétomoteurs

1.5.2 Le codage neurochimique

Les neurones entériques produisent et libèrent une trentaine de substances différentes (McConalogue and Furness 1994). Ces substances ont été classées en différentes catégories. Les neurotransmetteurs primaires regroupent l'ensemble des molécules produites et sécrétées d'une façon plus ou moins uniforme par les

1.5.3 Contrôle des fonctions gastro-intestinales par les neurones entériques

Le SNE est responsable du contrôle des différentes fonctions gastro-intestinales comme la motricité intestinale, la sécrétion intestinale et des propriétés de la barrière épithéliale intestinale (BEI), le flux sanguin et le système immunitaire.

1.5.3.1 Contrôle de la motricité intestinale

La motricité gastro-intestinale est un processus intégré qui comprend différentes composantes comme l'activité myoélectrique, l'activité contractile, le tonus et le transit. Les cellules musculaires lisses du TD sont organisées en deux couches distinctes : une première couche externe assez fine constituée de fibres musculaires longitudinales et une couche interne plus épaisse constituée de fibres musculaires circulaires (Figure 1) (Olsson and Holmgren 2001). Les muscles lisses du TD présentent deux types de contraction : une contraction rythmique et une contraction tonique permettant des mouvements de mixage et de propulsion. Les mécanismes contrôlant ces deux types de contraction sont bien distincts avec des composantes cellulaire, électrique et neurohumorale spécifiques. La contraction tonique du TD peut avoir deux origines : neurogénique et myogénique. Le tonus

neurogénique résulte d'une innervation excitatrice de base alors que le tonus myogénique résulte d'une propriété du muscle lui-même (Gregersen et al. 1992).

La recherche de l'origine de rythmicité des contractions intestinales a permis d'identifier des régions pacemaker, localisées dans les bordures des muscles circulaire et longitudinal. Ces régions pacemaker contiennent les cellules interstitielles de Cajal (CIC) qui forment un réseau au niveau de ces régions. Ce sont des cellules étoilées avec de larges noyaux et une abondante surface cavéolée. La distribution des CIC dépend de l'espèce, de l'âge et de la région du TD mais elles sont retrouvées dans les couches musculaires circulaire et longitudinale depuis l'œsophage jusqu'à l'anus. Les CIC sont équivalentes aux fibres de Purkinje dans le cœur. Elles établissent des contacts entre elles, avec les cellules musculaires et avec les terminaisons nerveuses et fonctionnent comme les pacemakers des muscles gastro-intestinaux en initiant l'activité électrique rythmique (Vanderwinden 1999). Les CIC expriment des récepteurs aux neuromédiateurs excitateurs comme les récepteurs muscariniques ou des récepteurs aux tachykinines, mais aussi des récepteurs à des neuromédiateurs inhibiteurs comme le VIP ou le NO (Kunze and Furness 1999; Camilleri 2001). Une absence ou une altération des CIC entraîne des troubles de la motricité gastro-intestinale (distension gastrique, motricité intestinale anormale, pseudo-obstruction intestinale, achalasie, etc.) (Sanders et al. 1999; Camilleri 2001).

La définition du péristaltisme a été introduite par Modlin et al en 2000 mais cette propriété a été montrée pour la première fois en 1899 suite aux expériences de Bayliss et Starling (Bayliss and Starling 1899; Modlin et al. 2000). Il s'agit d'un réflexe activant un circuit nerveux aboutissant à une contraction du côté oral et une relaxation du côté anal du stimulus. Répété de manière séquentielle le long du TD, ce réflexe permet la progression du bol alimentaire dans l'intestin (Figure 6).

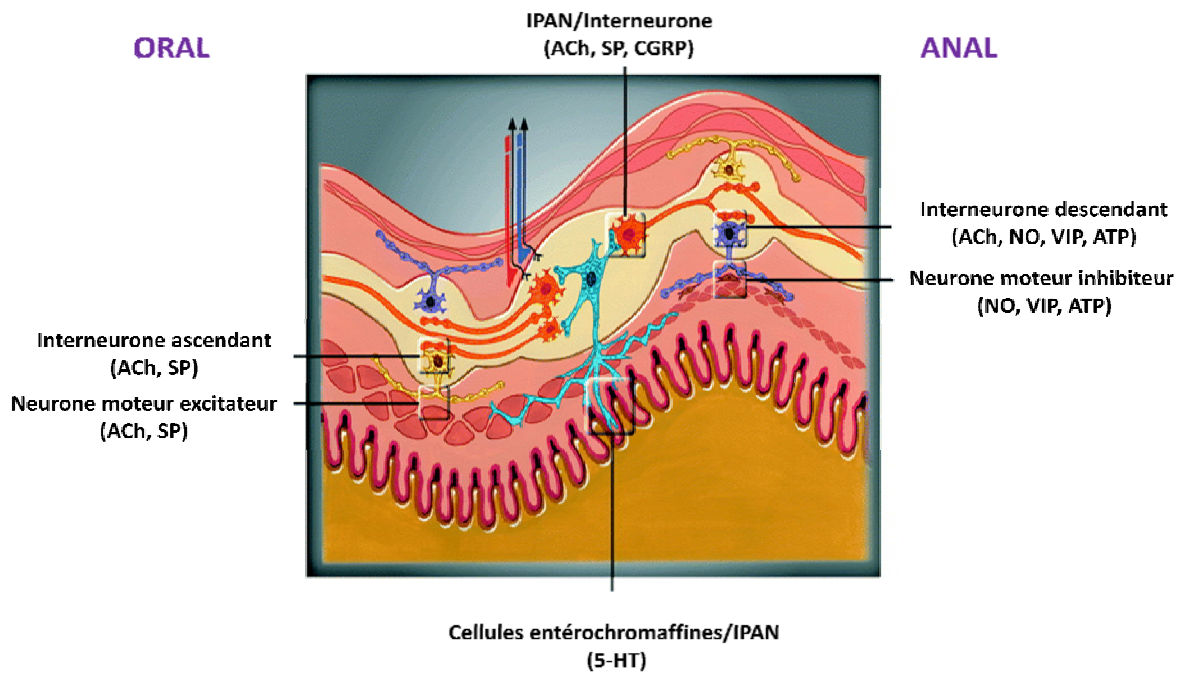


Figure 6: Schéma représentant le réflexe péristaltique dans l'intestin grêle

Suite à une stimulation de la muqueuse, la sérotonine (5-HT) est libérée par les cellules entérochromaffines et va activer les récepteurs 5-HT_{1P} et 5-HT₄ exprimés par les neurones primaires afférents intrinsèques (IPANs). Les IPANs vont libérer la substance P, l'acétylcholine (ACh) et le CGRP (Calcitonin gene-related peptide) et vont activer les interneurones ascendants et descendants. Les interneurones ascendants vont libérer de l'ACh et de la substance P et activer ainsi les neurones moteurs excitateurs. Ces derniers vont alors libérer de l'ACh et de la substance P au niveau oral et induire une contraction du muscle. D'autre part, les interneurones descendants vont libérer de l'ACh, du NO (nitric oxide), du VIP (vasoactive intestinal peptide) et de l'ATP, et ainsi activer les neurones moteurs inhibiteurs qui libèrent du NO, du VIP et de l'ATP provoquant une relaxation du muscle. Ce réflexe se répète de manière séquentielle le long de l'intestin et permet ainsi la progression du bol alimentaire (Hansen 2003).

(M) Muqueuse; (MC) Muscle circulaire ; (ML) muscle longitudinal ; (PM) Plexus myentérique.

Les cellules interstitielles de Cajal ne sont pas représentées sur ce schéma.

Le réflexe péristaltique peut être initié par un stimulus au niveau de la lumière intestinale. Ce stimulus peut être mécanique (distension mécanique ou frottement de la muqueuse dus au passage du bol alimentaire) ou chimique (diminution du pH, variation de l'osmolarité, présence d'acides gras ou de glucides). Ces différents stimuli vont ainsi activer les cellules endocrines de la muqueuse comme les cellules entérochromaffines, qui représentent la population majoritaire

de cellules endocrines dans l'épithélium. Les cellules entérochromaffines activées vont libérer la 5-HT et activer ainsi les terminaisons nerveuses des IPAN présentes dans la muqueuse intestinale (Figure 6). Les IPAN sont connectés aux interneurons et vont libérer différents neuromédiateurs comme l'ACh, la calbindine, la substance P et le calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Furness 2000; Wolf et al. 2007). Les interneurons ascendants et descendants établissent des connections avec les neurones moteurs, élément final dans le circuit du réflexe péristaltique. Les neurones moteurs ascendants sont excitateurs et leur activation provoque une contraction du muscle. A l'inverse, les neurones descendants sont inhibiteurs et induisent une relaxation du muscle (Figure 6).

Par ailleurs, le TD est relié au SNC par les afférences et efférences du SN autonome, constituant l'axe cerveau-tube digestif (*'brain-gut axis'*). Le SNC est capable de moduler indirectement sans vraiment contrôler l'activité motrice du TD. Il envoie ses instructions via les 2 composantes du SN autonome : le SN sympathique et le SN parasympathique. Les fibres parasympathiques transmettent leurs instructions en libérant l'ACh qui va accélérer la motricité alors que les fibres sympathiques vont elles libérer la noradrénaline (NA), la SOM et le NPY qui vont ralentir la motricité.

1.5.3.2 Contrôle de la sécrétion intestinale

La muqueuse intestinale est constituée par une monocouche de cellules, les cellules épithéliales intestinales (CEI), qui forment une barrière séparant l'organisme du milieu extérieur (lumière intestinale). Les CEI absorbent de très grandes quantités d'eau et d'ions d'une manière quotidienne. En présence de pathogènes comme les toxines bactériennes, la muqueuse intestinale réagit en sécrétant du fluide dans la lumière et en accélérant le transit afin de l'éliminer. Ces mouvements des fluides résultent de la variation des gradients osmotique, générée suite à la stimulation et/ou l'inhibition du transport d'ions à travers l'épithélium digestif. Ceci résulte en un déséquilibre absorption/sécrétion au profit de la seconde conduisant à une perte importante d'eau et d'ions dans les fèces. C'est ce

qui constitue les symptômes de la diarrhée. Ainsi le contrôle du statut de la barrière épithéliale intestinale (BEI) et donc des activités d'absorption et de sécrétion relève des responsabilités du SNE.

Les études anatomiques et fonctionnelles ont montré que le plexus sous-muqueux est responsable du contrôle des fonctions de la barrière alors que le plexus myentérique régule plutôt les fonctions motrices. En réalité, les interactions qui sont établies entre ces deux plexus laissent supposer que le réseau formé par l'ensemble des neurones sous-muqueux et myentériques est responsable à la fois des fonctions motrices et des fonctions sécrétoires du tube digestif (Cooke 2000).

La BEI est innervée par un grand nombre de fibres nerveuses. La majorité de ces fibres parcourent une faible distance de quelques millimètres puisqu'elles proviennent des ganglions sous-muqueux (Ekblad et al. 1987; Furness et al. 1987). Cependant certaines de ces fibres proviennent directement des ganglions myentériques et d'autres appartiennent au système nerveux autonome. Les fibres provenant du plexus sous-muqueux forment un réseau très dense entourant les villosités. Ces fibres contiennent des varicosités qui stockent et libèrent les neurotransmetteurs à proximité de la barrière.

Les réflexes sécrétomoteurs sont initiés suite à des interactions chimiques et mécaniques avec le contenu de la lumière intestinale (Figure 7). Un des stimuli importants provoquant la sécrétion est le transport actif de nutriments comme le glucose (Kunze and Furness 1999). Les réponses réflexes locales sont médiées pour la plupart par des neurones non cholinergiques via la libération de VIP ou de substance P ainsi que des neuromodulateurs comme l'ATP ou le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP). Un autre neuromédiateur important est la 5-HT, libérée par les cellules entérochromaffines. La 5-HT va activer les IPANs qui vont stimuler des neurones sécrétomoteurs cholinergiques et VIPergiques sensibles à la TTX. L'activation de ces neurones dans le plexus sous-muqueux se fait via les récepteurs nicotiniques ou les récepteurs aux neurokinines NK1 et NK2.

L'ACh et le VIP libérés par les neurones sécrétomoteurs vont se lier aux récepteurs des cellules épithéliales et stimuler la sécrétion d'ions chlorures et de fluides et empêcher l'entrée d'ions sodium (Hansen and Skadhauge 1997). Par ailleurs de nombreuses substances comme le glutamate et le PACAP modulent l'activité de ces neurones sécrétomoteurs afin d'augmenter ou d'inhiber la sécrétion d'eau et d'ions par les cellules épithéliales (Cooke 2000).

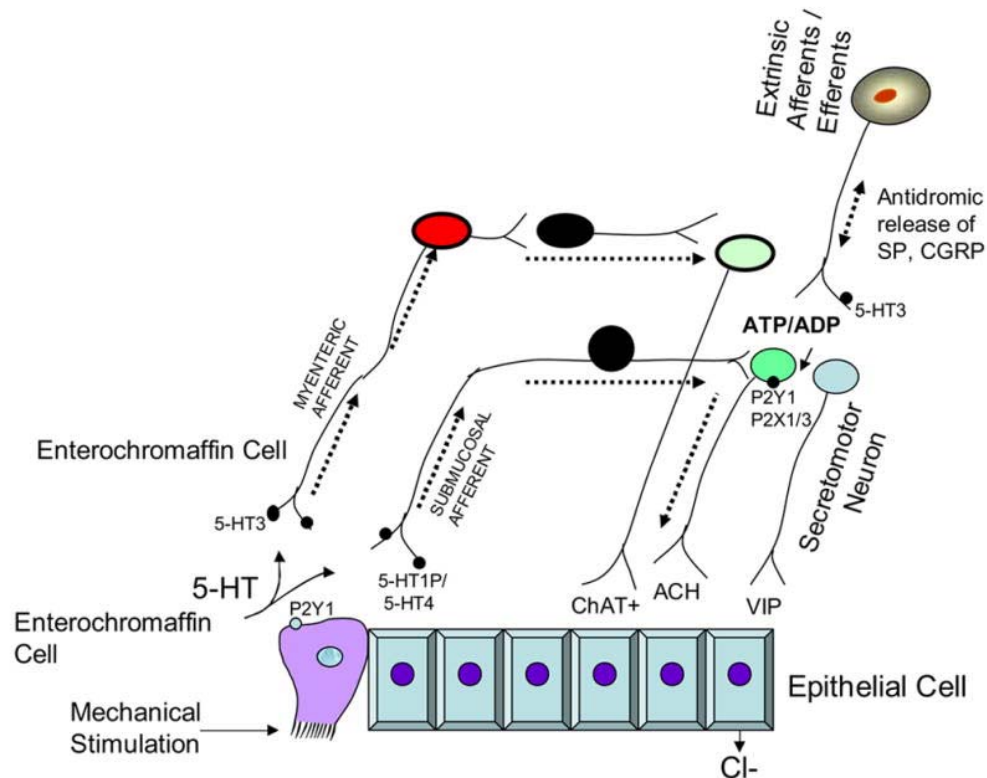


Figure 7 : Réflexe sécrétomoteur

Suite à une stimulation mécanique au niveau de la muqueuse, les cellules entérochromaffines (enterochromaffin cells) libèrent de la 5-HT (5-hydroxytryptamine ou sérotonine) activant l'arc réflexe sécrétomoteur. Lors d'un frottement mécanique appliqué sur la muqueuse, seuls les IPANs (intrinsic primary afferent neurons) du sous-muqueux sont impliqués par opposition à une distension de la muqueuse qui fait intervenir les voies afférentes extrinsèques (extrinsic afferents). Les neurones sécrétomoteurs (secretomotor neurons) ascendants sont cholinergiques tandis que les neurones sécrétomoteurs (secretomotor neurons) descendants sont VIPergiques. La libération du VIP (vasoactive intestinal peptide) et de l'ACh (acétylcholine) par les neurones sécrétomoteurs (secretomotor neurons) entraîne la libération d'ions chlorures par les cellules épithéliales intestinales (epithelial cell). D'après Xue et al, 2007.

1.5.3.3 Contrôle des propriétés de la barrière épithéliale intestinale

Le SNE joue un rôle majeur dans le contrôle des fonctions de la BEI, notamment dans le contrôle de la prolifération et de la perméabilité des cellules épithéliales intestinales (CEI). La perméabilité membranaire comporte deux composantes majeures. La composante paracellulaire permet un passage sélectif des molécules grâce aux jonctions serrées (*tight junctions*) situées au niveau du pôle apical. Une deuxième composante transcellulaire est responsable du transport de molécules de grande taille jusqu'à la *lamina propria* par des endosomes. La régulation de la perméabilité par des neurotransmetteurs comme l'ACh, le VIP ou la substance P a été montrée à la fois *in vivo* et *in vitro* (Hallgren et al. 1998; Hardin et al. 1999; Hayden and Carey 2000). Par exemple, l'étude effectuée par Cameron et Perdue (2007) montre que l'ACh augmente la perméabilité transcellulaire de macromolécules via les récepteurs muscariniques (isoforme M3) exprimés par les CEI (Cameron and Perdue 2007). Par ailleurs l'effet des neurones entériques sur la BEI a été montré sur des modèles *in vitro* (Hallgren et al. 1998; Neunlist et al. 2003). Notamment il a été montré que les voies VIPergiques induisent une augmentation de la perméabilité paracellulaire des lignées épithéliales HT-29 et Caco-2 en augmentant l'expression de la protéine des jonctions serrées ZO-1 (Neunlist et al. 2003).

Par ailleurs, le SNE semble impliqué dans le contrôle de la prolifération des CEI. En effet il a été montré dans une étude *in vivo* que le glucagon-like peptide 2 (GLP-2) augmente la prolifération des cellules précurseurs des CEI via l'activation des neurones entériques (Bjerknes and Cheng 2001). Une autre étude réalisée sur un modèle de co-culture *in vitro*, montre que les neurones sous-muqueux humains inhibent la prolifération des CEI via la voie VIPergique (Toumi et al. 2003). D'autres neuromédiateurs jouent un rôle dans la modulation de la prolifération comme l'analogue de la somatostatine, l'octreotide, qui inhibe la prolifération des CEI (Thompson et al. 1993) ou l'ATP (Jessen et Mirsky 1985) et l'ADP qui inhibent la prolifération des CEI mais stimulent leur migration (Dignass et al. 1998).

1.6 La cellule gliale entérique

1.6.1 Les cellules gliales entériques : morphologie et marqueurs spécifiques

Au cours de ses observations en 1891, Dogiel a noté la présence dans le SNE de cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques. Ces cellules, assimilées d'abord à des cellules de Schwann, sont retrouvées en très grand nombre en périphérie des corps cellulaires et tout au long des fibres nerveuses (Stohr 1952) (Figure 8). La caractérisation de cette population a pu être réalisée grâce aux techniques d'immunohistochimie qui ont montré que ces cellules expriment la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) (Jessen and Mirsky 1983) et la *S100 Ca²⁺ binding protein* (Ferri et al. 1982), deux protéines caractéristiques des astrocytes du SNC. Confortant ces données, les observations en microscopie électronique ont montré que ces cellules gliales sont très différentes des cellules de Schwann présentes dans les ganglions périphériques, mais similaires dans leur infrastructure aux astrocytes (Gabella 1971; Cook and Burnstock 1976).

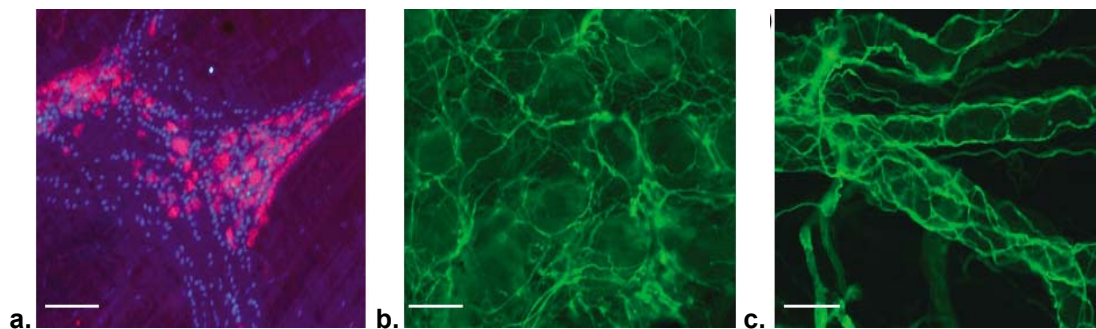


Figure 8 : Les cellules gliales entériques (CGE) sont présentes à la fois dans les ganglions et autour des fibres interganglionnaires et à proximité de la BEI à et des vaisseaux sanguins

(a) Les CGE immunoréactives pour Sox-10 (en bleu) sont beaucoup plus nombreuses que les neurones entériques immunoréactifs pour Hu (en rouge). Photographie en microscopie à fluorescence de plexus myentérique de singe (échelle 100 μ m). **(b,c)** Les CGE forment un dense réseau entourant les cryptes **(b)** et les vaisseaux sanguins **(c)**. Photographie en microscopie à fluorescence de muqueuse colique humaine (échelle 25 μ m). D'après Neunlist et al. 2008.

Ces cellules de type astrocytaire ou cellules gliales entériques (CGE) sont beaucoup plus nombreuses que les neurones entériques. Ainsi, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones entériques chez le cobaye est de 0,8-1,0 dans le plexus sous-muqueux versus 1,7 dans le plexus myentérique. Chez l'homme, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones est de 1,3 à 1,9 dans le plexus sous-muqueux versus 5,9 à 7,0 le plexus myentérique (Hoff et al. 2008). Les CGE sont retrouvées à la fois dans les ganglions et autour des fibres interganglionnaires des plexus myentérique et sous-muqueux et à proximité de la BEI, où les CGE entourent les villosités et les vaisseaux sanguins (Figure 8). Elles forment ainsi un réseau glial dense et étendu à tous les niveaux du TD (Ruhl 2005) (Figure 9).

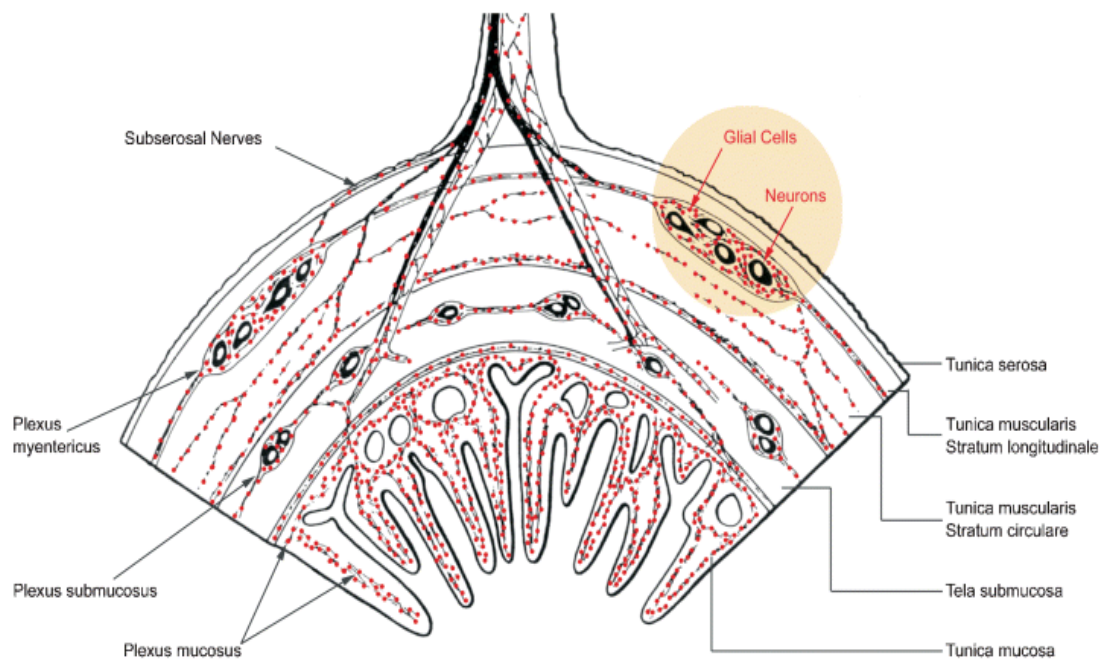


Figure 9 : Localisation des cellules gliales entérique dans le tube digestif

Schéma d'une coupe transversale de la paroi digestive présentant les plexus formant le système nerveux entérique et les cellules gliales entériques ou CGE (glial cells) présentées sous forme de pointillés rouges. Les CGE forment un réseau cellulaire très dense associé aux neurones au sein des plexus myentérique et sous-muqueux mais aussi dans les plexus aganglionnaires où elles seraient associées aux fibres nerveuses. D'après (Ruhl 2005).

Tout comme les astrocytes, les CGE sont des cellules étoilées de petite taille présentant des extensions de taille et de forme variées. Au sein des ganglions, les CGE ont des extensions très courtes et sont empaquetées autour des neurones alors qu'au niveau des fibres interganglionnaires, les CGE ont de très longues extensions qui vont entourer les axones de plusieurs neurones. Une seule CGE entoure plusieurs neurones à la fois. Les CGE forment un syncytium entre elles via des jonctions communicantes (*GAP junctions*) de façon similaire aux astrocytes (Maudlej and Hanani 1992).

Une différence majeure existe concernant l'organisation structurale et histologique des CGE chez les petits mammifères (souris, cobaye, etc.) et chez les mammifères de grande taille (homme, chien, etc.). Chez les petits mammifères, les CGE possèdent ainsi des extensions radiaires entourant les faisceaux de neurites ; une seule cellule gliale peut recouvrir de ses prolongements jusqu'à 600 neurites (Gabella 1981). En revanche, cette organisation en faisceaux n'est pas retrouvée chez l'homme et les mammifères de grande taille. Les neurones sont séparés les uns des autres par des extensions gliales qui entourent la totalité de la surface neuronale (Baumgarten et al. 1970). Cette différence histologique entre l'homme et les petits mammifères avait déjà été notée par Auerbach en 1864. Confirmant ces observations, le ratio CGE/neurones augmente avec la taille de l'espèce (Gabella and Trigg 1984).

Du point de vue cytogique, le noyau des CGE se distingue très facilement du noyau des neurones. Il se caractérise par la présence de blocs de chromatine situés à proximité de la membrane nucléaire, elle-même caractérisée par la présence d'invaginations profondes. Par ailleurs, les CGE contiennent des gliofilaments caractéristiques de 10 nm de diamètre. Des faisceaux de gliofilaments semblent ancrés à des agrégats moléculaires à la surface de la membrane. Ces faisceaux traversent le corps cellulaire et se projettent dans l'axe des extensions gliales, leur permettant d'adhérer aux surfaces ganglionnaires (Gabella 1981). La composante majeure de ces gliofilaments est la GFAP (Jessen and Mirsky 1980). Les CGE expriment d'autres marqueurs spécifiques comme la vimentine, la protéine

S100 β mais aussi certaines enzymes comme la glutamine synthétase et ainsi que l'antigène de surface Ran-2 (Jessen and Mirsky 1985).

1.6.2 Développement des cellules gliales entériques

Les CGE dérivent des cellules de la crête neurale, qui donnent naissance à la fois aux précurseurs neuronaux et aux précurseurs gliaux (Gershon and Rothman 1991; Young et al. 2003). Alors que les neurones entériques se différencient à partir du stade E10.5 et sont identifiés au niveau du front de migration, les CGE restent en aval à une certaine distance du front de migration (Young et al. 2003). Les précurseurs qui entrent dans le tube digestif et entament une migration dans le sens rostro-caudal vont en effet se séparer en deux populations : les précurseurs neuronaux et les précurseurs gliaux. La migration et la différenciation des précurseurs gliaux est sous le contrôle de différents gènes et facteurs environnementaux, principalement la neurotrophine-3 (NT-3) qui active le récepteur à tyrosine kinase TrkC (Chalazonitis et al. 1998). Ce récepteur est également régulé par les protéines bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) et BMP-4, membres de la superfamille TGF- β (Chalazonitis et al. 2004). D'autres facteurs sont également impliqués dans le développement des CGE : le ciliary neurotrophic factor (CNTF) et le leukemia inhibitory factor (LIF) via les sous-unités alpha (CNTFR α) et beta (gp130 et LIFR β) du récepteur au CNTF, respectivement (Chalazonitis et al. 1998) ; les neurégulines (NRGs) via le récepteur ErbB3 et son corécepteur ErbB2 (Marchionni et al. 1993). Enfin les facteurs de transcription Sox-8 et Sox-10 jouent un rôle crucial dans le développement des CGE puisque Sox-10 contrôle l'expression du récepteur erbB3 par les cellules de la crête neurale (Britsch et al. 2001; Maka et al. 2005).

Certaines études suggèrent l'existence de populations bien distinctes de CGE. Cette distinction était quelquefois basée sur des différences morphologiques entre les CGE entourant les corps cellulaires, qui possèdent des extensions très courtes, et celles localisées au niveau des fibres nerveuses qui ont de très longues extensions. L'existence de CGE présentant les deux types d'extensions empêche

cependant toute distinction basée sur ce critère. D'autres études se sont basées sur les différences d'expression de la GFAP ou de production de cytokines entre les CGE. L'expression de ces protéines étant modulée par différents facteurs environnementaux, il est cependant difficile de confirmer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des populations gliales (Ruhl 2005).

L'analogie entre CGE et astrocytes du SNC trouve ses limites dans le fait que le microenvironnement des CGE est complètement différent de celui des astrocytes. De même, alors que le développement des CGE est contrôlé en partie par les NRG, celui des astrocytes ne l'est pas. Par ailleurs, la production d'interleukine-6 (IL-6) par les CGE et la modulation de cette production par d'autres cytokines (IL-1 β) soulignent d'autres différences existant entre ces deux types cellulaires (Ruhl et al. 2001; Crone et al. 2003).

1.6.3 Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques

Pendant des années les cellules gliales ont été considérées comme des simples cellules de support du système nerveux, ce qui leur a donné leur nom (glie = 'glue' en grec). Ce concept est totalement dépassé suite aux nombreux travaux montrant l'implication des cellules gliales dans le contrôle des fonctions neuronales. Par ailleurs, les CGE interagissent avec les autres types cellulaires présents dans leur environnement et interviennent dans la régulation de leurs fonctions. Des études montrent par exemple le rôle des CGE dans le contrôle des fonctions de la BEI, ce qui autorise certaines analogies avec le contrôle de la barrière hémato-encéphalique exercé par les astrocytes du SNC (Neunlist et al. 2008).

1.6.3.1 Interactions glie-neurones : contrôle des fonctions neuronales par les cellules gliales entériques

L'importance des CGE dans le contrôle des fonctions neuronales a été soulignée par leur invalidation spécifique dans deux modèles murins transgéniques. La destruction spécifique des CGE est associée à une dégénérescence des neurones entériques (Bush et al. 1998) ou à une modulation du codage neurochimique si la

destruction est plus modérée (Aube et al. 2006). Ceci suggère le rôle crucial que jouent les CGE dans la régulation des fonctions neuronales. Le contrôle glial pourrait s'effectuer à différents niveaux, de l'apport nutritionnel à la production de facteurs neurotrophiques afin d'assurer un microenvironnement neuronal protégé.

1.6.3.1.1 La cellule gliale entérique comme élément de support

Le rôle de support a été le premier rôle attribué à la cellule gliale. En effet, les CGE jouent un rôle de soutien mécanique et nutritionnel des neurones entériques. Tout d'abord, il a été montré que les CGE favorisaient la mise en place et la structuration spatiale des ganglions entériques. Ceci est dû principalement à la présence des gliofilaments qui permettent l'ancrage des CGE à la surface des ganglions (Gabella 1990). Il en résulte un réseau dense de CGE entourant la surface ganglionnaire. Cela étant, loin d'assurer un soutien passif, les CGE répondent aux stimulations mécaniques par une surexpression du gène *c-fos* (gène de réponse précoce souvent utilisé comme marqueur d'activité neuronale) mais aussi par une augmentation de leur taux intracellulaire de calcium, et ces ondes calciques peuvent se propager vers les autres CGE (Sharkey et al. 1999; Zhang et al. 2003).

Les CGE jouent également le rôle de support nutritionnel et de protection en garantissant aux neurones un microenvironnement protégé. Ce rôle est illustré principalement par la production de facteurs neurotrophiques comme le GDNF et la neurotrophin-3 dont le rôle précis n'est pas encore identifié (Hoehner et al. 1996; Bar et al. 1997). Par ailleurs, différentes études ont montré que les CGE représentent une source majeure d'acides aminés utilisés par les neurones, pour la synthèse de neurotransmetteurs. La L-arginine par exemple, exclusivement produite par les CGE, est indispensable à la synthèse du NO (Nagahama et al. 2001).

1.6.3.1.2 Contrôle de la neurotransmission

De nombreuses études ont montré que les CGE jouaient un rôle dans la neurotransmission. Les CGE semblent être impliquées à la fois dans la synthèse et l'élimination de neurotransmetteurs, mais elles peuvent aussi jouer un rôle actif dans le processus de neurotransmission proprement dit.

Des études immunohistochimiques ont montré l'expression exclusive de la glutamine synthétase par les CGE (Jessen and Mirsky 1983). Cette enzyme responsable de la conversion du glutamate en glutamine assure un double rôle : le premier est de détoxifier le milieu extracellulaire des molécules de glutamate qui peuvent être excitotoxiques à forte concentration ; le second consiste à approvisionner les neurones en molécules de glutamine nécessaires à la synthèse de deux neuromédiateurs, le glutamate et l'acide γ -amino-butyrique (GABA) (Galligan et al. 2000). De plus, il a été montré que le transporteur GAT2 (γ -aminobutyric acid (GABA) transporter) est préférentiellement exprimé par les CGE, ce qui suggère leur implication dans l'élimination des molécules de GABA de l'espace extracellulaire (Fletcher et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré que les transporteurs d'oligopeptides PEPT2 sont exprimés d'une façon majoritaire par les CGE (Ruhl et al. 2005), leur permettant ainsi de récupérer et d'éliminer les produits de dégradation des neuropeptides tels que le VIP afin de les recycler.

Les CGE sont également impliquées dans la transmission nitrergique puisqu'elles sont la principale source de L-arginine, précurseur du monoxyde d'azote (NO) neuronal (Nagahama et al. 2001; Fletcher et al. 2002). L'implication des CGE dans la transmission nitrergique et peptidergique a été confirmée suite à la destruction partielle des CGE qui induit une diminution du niveau d'expression des deux neuromédiateurs, le NO et le VIP, dans les neurones entériques (Aube et al. 2006). Les CGE semblent aussi jouer un rôle dans la transmission purinergique. L'expression de l'ecto-nucléotidase NTPDase-2 localisée à la surface des CGE mais absente des neurones, suggère que les CGE contrôlent la disponibilité des bases purinergiques ATP et ADP (Braun et al. 2004). Enfin, les CGE expriment les canaux potassiques voltage-dépendants ce qui leur permet de réguler la concentration extracellulaire d'ions K^+ , dont l'accumulation peut affecter l'activité neuronale (Hanani et al. 2000).

Par ailleurs, il a été montré que les CGE expriment des purinorécepteurs (sous types P2X7 et P2Y2) (Kimball and Mulholland 1996; Vanderwinden et al. 2003) et répondent aux agonistes ATP et UTP par une augmentation du calcium

intracellulaire (Sarosi et al. 1998). Une autre étude montre que les CGE produisent l'ATP permettant la propagation d'ondes de calcium entre les CGE (Zhang et al. 2003). Ces ondes calciques sont principalement dues à la présence de jonctions communicantes entre les CGE (Hanani et al. 1989) et sont capables d'induire une réponse neuronale, ce qui confirme l'implication active des CGE dans le processus de neurotransmission.

1.6.3.1.3 Contrôle de la survie neuronale

Le rôle des CGE dans le contrôle de la survie neuronale a été très peu étudié. Leur implication a été suggérée par analogie avec les astrocytes du SNC. Et en effet, les CGE produisent et sécrètent des facteurs connus pour leurs rôles neurotrophiques et neuroprotecteurs dans le SNE ou dans le SNC, comme le GDNF, le NGF ou le GSNO (Anitha et al. 2006; von Boyen et al. 2006; Savidge et al. 2007).

L'étude des neuropathies digestives et certains modèles animaux suggèrent que les CGE jouent un rôle majeur dans le contrôle de la survie neuronale, par l'intermédiaire de facteurs sécrétés. Ces aspects seront développés dans le chapitre 3.3.

1.6.3.2 Interactions avec les cellules épithéliales intestinales

Il est évident que les CGE représentent les partenaires privilégiés des neurones entériques. Cependant, ces cellules semblent également interagir avec d'autres populations cellulaires présentes à proximité, notamment les CEI.

Les interactions glio-épithéliales ont été très peu étudiées mais il semblerait que ces interactions soient très similaires aux relations qui existent entre les astrocytes et les cellules endothéliales pour former la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet plusieurs études ont montré dans des modèles *in vivo* et *in vitro* que les astrocytes contrôlent les fonctions de la BHE (Beck et al. 1984; Janzer and Raff 1987). Par analogie aux astrocytes du SNC, on prête aux CGE un rôle similaire sur la BEI. Quelques éléments en faveur de cette hypothèse sont issus de l'étude d'un modèle murin transgénique dépourvu de CGE (souris GFAP-HSV-TK)

(Bush et al. 1998). La déplétion des CGE a entraîné chez ces souris des altérations majeures de l'intégrité de la BEI. Ces effets des CGE ont été récemment confirmés *in vitro* : dans ce modèle les CGE inhibaient la prolifération des cellules épithéliales Caco-2, induisaient une augmentation de leur résistance transépithéliale et augmentaient l'expression de la protéine des jonctions serrées ZO-1. Ces effets seraient médiés par le S-nitroglutathion (GSNO), molécule produite et sécrétée par les CGE (Savidge et al. 2007). Une autre étude montre également les effets antiprolifératifs des CGE dans un modèle de co-culture via la libération de TGF- β 1 (Neunlist et al. 2007).

Par ailleurs, une analyse transcriptomique récente a montré que les CGE modulaient les fonctions impliquées dans la motilité, la morphologie, l'adhésion et la prolifération des CEI (Van Landeghem et al. 2009, en révision). Plus particulièrement, il semblerait que les CGE soient impliquées dans la modulation de la réparation et de la restitution épithéliales en augmentant l'étalement des CEI via la libération du proEGF. Ces effets réparateurs des CGE sont médiés par l'augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine FAK (Focal adhesion kinase) dans les cellules Caco-2 via une voie dépendante de l'EGFR (Van Landeghem et al. 2009, en révision).

Enfin, d'autres médiateurs gliaux comme le GDNF, S100 β ou IL-6 semblent également impliqués dans la modulation des fonctions de la BEI, même si leur implication n'est pas directement démontrée (Bar et al. 1997; Ruhl et al. 2001; Neunlist et al. 2008).

2 Le stress oxydant et son implication dans les maladies neurodégénératives

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Ce déséquilibre en faveur d'un état oxydant peut être dû soit à un excès de production d'agents pro-oxydants, principalement représentés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), soit à un défaut des défenses anti-oxydantes. Cette rupture d'équilibre peut avoir des origines multiples, micro-environnementales et/ou génétiques. Après avoir présenté les deux composantes oxydantes et anti-oxydantes et les conséquences cellulaires du déséquilibre, l'implication du stress oxydant dans les maladies neurodégénératives et dans les pathologies digestives sera analysée.

2.1 Systèmes oxydants: les espèces réactives de l'oxygène

Chez les organismes vivants en aérobie, la phosphorylation oxydative mitochondriale aboutit à la production d'énergie, stockée sous forme de molécules d'ATP, et au transfert des électrons sur les molécules d'oxygène. Le transfert partiel des électrons sur des molécules d'oxygène lors du métabolisme mitochondrial conduit à la production de molécules intermédiaires instables comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est une forme radicalaire (électron instable facilement échangeable) centrale parmi les ERO (Figure 10). Les ERO sont beaucoup plus réactives que les molécules d' O_2 . Elles comprennent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) mais aussi des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) (Simonian and Coyle 1996). Certaines de ces espèces sont extrêmement réactives et instables, tels l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, d'autres comme l' H_2O_2 sont relativement plus stables et peuvent diffuser librement. Toutefois, l' H_2O_2 peut réagir avec les métaux de transition tels que le cuivre cuivreux et le fer ferreux, et se décomposer en radical hydroxyle via la réaction de Fenton. L'anion radicalaire

superoxyde occupe une position centrale et est à l'origine directement ou indirectement d'autres ERO et aussi d'espèces réactives de l'azote comme l'anion peroxy-nitrite (ONOO^-) après interaction avec le monoxyde d'azote NO . Même si la mitochondrie est un lieu privilégié de production des ERO, d'autres compartiments cellulaires comme le cytosol, les membranes du réticulum endoplasmique et la membrane plasmique peuvent être très actifs notamment par l'action de différentes oxydases. Certaines molécules peuvent générer par auto-oxydation des ERO : c'est le cas de la dopamine (Clement et al. 2002).

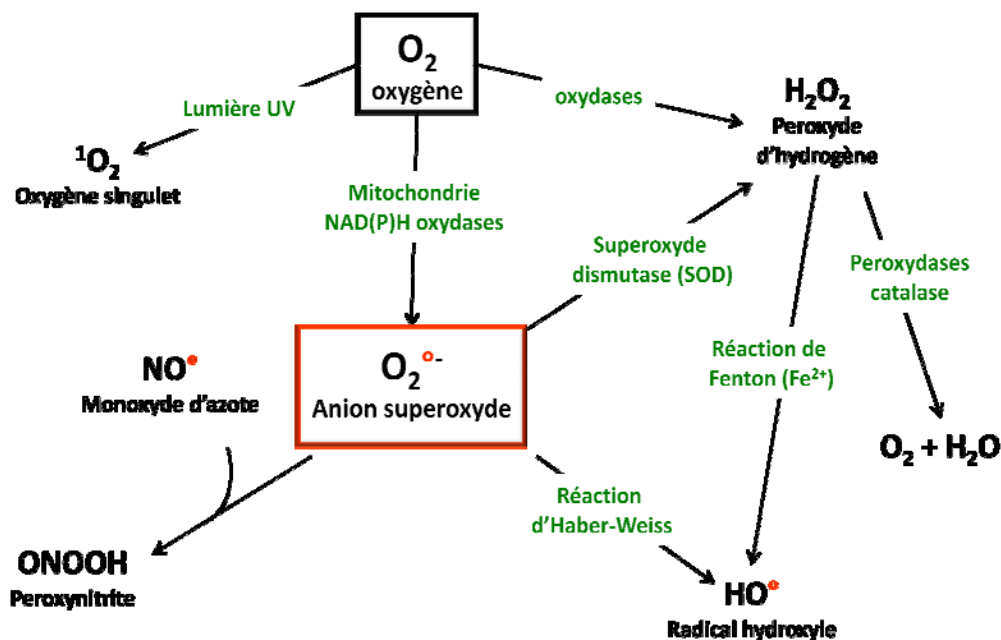


Figure 10 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Ce schéma présente les différents types d'ERO et leur production au niveau cellulaire. Les ERO regroupent à la fois les radicaux libres (OH^\cdot , O_2^\cdot) ou des molécules très réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est susceptible de libérer des radicaux hydroxyles selon la réaction de Fenton, en présence d'ions ferreux, ou via la réaction d'Haber-Weiss. Certaines molécules sont extrêmement réactives comme le peroxy-nitrite ONOO^- qui est formé suite à la réaction entre les molécules de NO et les radicaux O_2^\cdot . Ce schéma montre également le rôle des différentes enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX).

La production des ERO est sans conséquence délétère si elle reste modérée ; mais une activité mitochondriale accrue ou des situations de troubles nutritionnels, inflammatoires ou génétiques peuvent l'accroître. L'inflammation est notamment associée à une production importante d'espèces radicalaires par les cellules phagocytaires activées au cours d'un phénomène appelé " l'explosion oxydative ". Ce phénomène consiste à activer les NADPH oxydases au niveau de la membrane cellulaire, dans le but de produire des quantités importantes d'anions superoxydes et d' H₂O₂ libérés à l'intérieur des phagosomes.

2.2 Les systèmes de défense antioxydants

Les systèmes antioxydants regroupent un ensemble de molécules et d'enzymes capables d'inhiber la production des ERO et leur transformation (Sies 1997). On distingue d'abord les systèmes de défense non-enzymatiques regroupant des molécules anti-oxydantes comme la vitamine E, la vitamine C et les caroténoïdes, l'acide urique, le glutathion, les thiols et les métallothiénines. Un autre système de défense de nature enzymatique est constitué par différentes enzymes: superoxyde dismutases (SOD), catalases (CAT), glutathion peroxydases (GPx), glutathion réductases (GR), le système thiorédoxine (Trx)/thiorédoxine réductase (TrxR), peroxirédoxines (Prx) et glutarédoxines (Grx) (Fridovich 1998; Kalinina et al. 2008; Reeves and Hoffmann 2009). Il existe enfin un troisième groupe formé par les protéines chélatrices du fer et du cuivre, comme la transferrine et l'hémosidérine pour le premier, l'albumine et la céruloplasmine pour le second. Ces chélateurs seraient ainsi impliqués dans la prévention du stress oxydant en séquestrant les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton.

2.2.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes impliquées dans la défense antioxydante sont activées dans des situations physiologiques pour éliminer les ERO produites au cours du métabolisme cellulaire. Les enzymes majeures sont les SOD, les catalases et les GPx (Figure 10).

2.2.1.1 Les superoxyde dismutases

Les SOD sont des enzymes antioxydantes essentielles permettant de transformer l'anion superoxyde O_2^- en H_2O_2 par dismutation. Trois formes de SOD existent chez l'homme, une forme cytosolique (cSOD), une forme mitochondriale (mSOD) et une forme extracellulaire (ecSOD). La réaction enzymatique est catalysée par différents ions métalliques situés au centre de l'enzyme et dont la nature permet de distinguer les différents sous-types de SOD : la SOD à Cuivre-Zinc (CuZn-SOD), la SOD à manganèse (Mn-SOD), la SOD à Fer (Fe-SOD) et la SOD à Nickel (Ni-SOD) (Banci et al. 1998; Barondeau et al. 2004; Kaynar et al. 2005).

2.2.1.2 Les catalases

L' H_2O_2 produit par les SOD est susceptible de produire des radicaux hydroxyles en présence de métaux (réaction de Fenton). Les catalases sont importantes pour dégrader l' H_2O_2 et empêcher son accumulation. Les catalases sont des enzymes tétramériques composées de quatre sous-unités de 60 KDa comportant chacune un noyau ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} (Ko et al. 2000). Elles sont particulièrement présentes dans les peroxysomes. Ces enzymes permettent de convertir l' H_2O_2 en molécules d'eau et d'oxygène moléculaire O_2 .

2.2.1.3 Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (Figure 10) sont des protéines tétramériques de 85 KDa (Flohe et al. 1973; Arthur 2000). Chaque sous-unité contient un atome de sélénium sous sa forme séléno-cystéine au niveau de son site actif. Les GPx appartiennent ainsi à la famille des enzymes sélénodépendantes ou sélénoprotéines (Reeves and Hoffmann 2009). Les GPx permettent de réduire l' H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques en présence de glutathion réduit et jouent ainsi un rôle majeur dans la défense antioxydante de l'organisme chez les mammifères.

Il existe 5 isoformes de GPx identifiées chez les mammifères. Même si leur expression est ubiquitaire, le niveau d'expression de ces 5 isoformes varie en fonction du type de tissu. La GPx1 est une protéine homotétramérique essentiellement localisée dans le cytoplasme et pour une faible part dans la matrice mitochondriale. La GPx1 est la plus abondante des GPx et est retrouvée dans un grand nombre de tissus (foie, reins, érythrocytes). La GPx2 est également un homotétramère avec une localisation cytoplasmique, en particulier dans les cellules épithéliales du tube digestif où elle aurait un rôle protecteur important contre le stress oxydant de l'intestin. La GPx3 est la seule GPx sécrétée et retrouvée dans le plasma. La principale source de GPx3 est représentée par le rein mais d'autres tissus (foie, cœur et cerveau) l'expriment aussi. La sécrétion de GPx3 pourrait être associée à une activité antioxydante extracellulaire locale en utilisant non seulement le glutathion réduit mais aussi la thiorédoxine ou la glutarédoxine comme substrat réducteur (Bjornstedt et al. 1994). La GPx4 est retrouvée dans la plupart des tissus (notamment le rein et les testicules), à la fois dans le cytoplasme et dans la fraction membranaire. La GPx4 ou PHGPx est capable de réduire directement les hydroperoxydes associés aux phospholipides, aux acides gras ou au cholestérol résultant de la peroxydation lipidique de la membrane plasmique (Imai et al. 1998). Enfin la GPx5 est exprimée spécifiquement dans l'épididyme et est la seule GPx dont l'activité est indépendante du sélénium (Vernet et al. 1996; Chabory et al. 2009). Même si le principal substrat des GPx est l' H_2O_2 , elles sont aussi capables de réagir directement avec les hydroperoxydes lipidiques. Elles représentent ainsi une voie majeure de défense contre le stress oxydant (Valko et al. 2007).

D'autres sélénoprotéines, comme la sélénoprotéine P, possèdent des capacités antioxydantes (Burk and Hill 2005). La sélénoprotéine P est une protéine principalement synthétisée par le foie et sécrétée dans le plasma. Elle est un transporteur important du sélénium. Elle possède également une activité peroxydase extracellulaire, surtout vis-à-vis des hydroperoxydes phospholipidiques, avec le glutathion ou d'autres donneurs d'électrons (thiorédoxine) comme co-

facteurs. La sélénoprotéine P est exprimée et probablement sécrétée par d'autres tissus, permettant une activité antioxydante extracellulaire locale.

2.2.2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques

La défense de l'organisme contre les ERO et le stress oxydant se fait aussi grâce à des molécules antioxydantes comme les vitamines E (tocophérols), C (acide ascorbique) et Q (ubiquinone), et les caroténoïdes qui sont apportés par l'alimentation. Ces molécules vont neutraliser les radicaux libres en captant l'électron célibataire. Ces molécules peuvent piéger les ERO (" effet scavenger "). Il existe par ailleurs des molécules endogènes comme le glutathion. Le glutathion, en tant que co-facteur de différents systèmes enzymatiques (voir ci-dessus), constitue une des principales molécules antioxydantes capable de protéger l'organisme contre les ERO radicalaires ou non-radicalaires.

2.2.2.1 Les vitamines E et C

La vitamine E regroupe l'ensemble des molécules présentant une activité biologique similaire à celle de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E comprend quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , qui ont des activités antioxydantes variables. L'isoforme α est la forme la plus active ; elle comporte une extrémité hydrophobe et une extrémité hydrophile. Son extrémité hydrophobe lui permet de s'insérer entre les acides gras des membranes et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par le stress oxydant (Khalil 2002). Les tocophérols oxydés nécessitent la présence de vitamine C pour se régénérer. Sans cette synergie d'action les tocophérols sont inactifs (Wang and Quinn 1999; Carr et al. 2000).

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble dans les conditions physiologiques. Elle n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle empêche l'oxydation des lipoprotéines provoquée par divers systèmes générateurs d'ERO comme les neutrophiles ou les cellules endothéliales activées. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par un état radicalaire intermédiaire, le

radical ascorbyl, qui est nécessaire à la régénération de la vitamine E oxydée (Sies and Stahl 1995; Stoyanovsky et al. 1995).

2.2.2.2 *Le glutathion*

C'est en 1921 que Frederick G Hopkins (Hopkins 1921) propose le terme de glutathion pour dénommer "*an autoxidisable constituent of the cell*" et remplacer celui de « philothion » proposé par Rey Pailhad en 1888 dans ses travaux sur la levure. Considéré comme la première ligne de défense antioxydante de l'organisme, le glutathion, ou tripeptide γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, représente le plus abondant thiol libre non protéique. Il existe sous une forme réduite, le GSH, majoritaire dans le milieu intracellulaire, et peut se transformer sous une forme oxydée, le GSSG, correspondant à deux molécules de GSH reliées par un pont disulfure au niveau des résidus cystéine. Sa concentration intracellulaire varie entre 0,5 et 10 mM alors que sa concentration plasmatique est entre 0,5 et 10 μ M.

La synthèse de ce tripeptide comprend 2 étapes enzymatiques dépendantes de l'ATP (Figure 11). La première étape, aboutissant à la formation du dipeptide glutamate-cystéine, est catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL), étape limitante de la synthèse du glutathion. La GCL est un hétérodimère avec une sous-unité catalytique (GCLc) et une sous-unité régulatrice ou "*modifier*" (GCLm) (Franklin et al. 2009). La seconde étape catalysée par la glutathion synthétase (GS) permet la liaison d'une molécule de glycine au dipeptide déjà formé. Le glutathion synthétisé peut ensuite exercer un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la GCL. Les variations du niveau intracellulaire de glutathion réduit (GSH) vont dépendre de la régulation de sa synthèse d'une part et de l'activité des multiples voies d'utilisation et de régénération du GSH (Figure 12). La synthèse du GSH va dépendre de la disponibilité en acides aminés et surtout de la cystéine (apport alimentaire, métabolisme de la méthionine, activité de la γ -glutamyl transpeptidase ou γ GT) et de l'activité des différentes enzymes impliquées dans la synthèse du GSH, en particulier la GCL (Lu 2009).

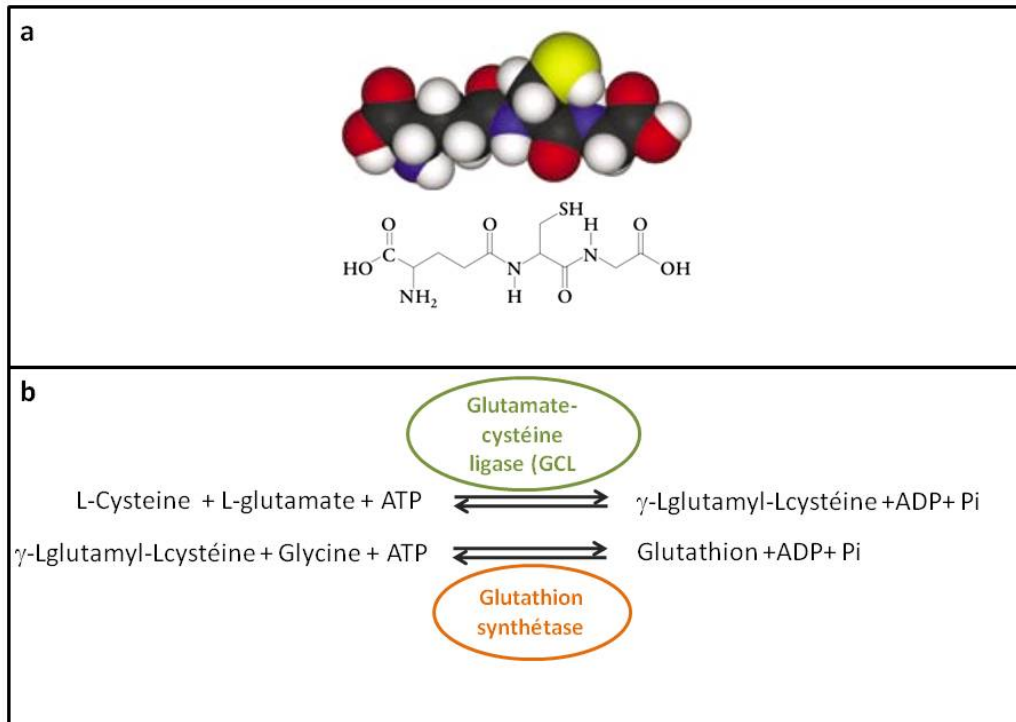


Figure 11 : Le glutathion, structure et réactions de synthèse

(a) Structure de la molécule de glutathion (Glu-Cys-Gly). **(b)** La synthèse du glutathion comprend 2 étapes enzymatiques ATP dépendantes. La première étape permet la formation du dipeptide γ -L-glutamylcystéine et est catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL). La seconde étape catalysée par la glutathion synthétase permet la liaison d'une molécule de glycine au dipeptide déjà formé.

2.2.2.3 Fonctions antioxydantes du glutathion

Comme le montre la figure 12, le glutathion est impliqué dans de nombreuses fonctions (Lu 2009): (1) détoxification de certaines molécules par les glutathion-S-transférases ou de concentrations toxiques de NO par la formation de GSNO ; (2) stockage de la cystéine évitant une auto-oxydation rapide sous forme de cystine et mise à disposition de la cystéine stockée par l'action conjointe de la γ GT et d'une dipeptidase ; (3) protection contre le stress oxydant.

L'action antioxydante du glutathion peut être médiée par différents mécanismes. Tout d'abord le glutathion peut agir d'une façon non-enzymatique avec différents types d'ERO comme l'anion superoxyde, le NO, le radical hydroxyle

et le peroxyde ONOO⁻ (Clancy et al. 1994; Winterbourn and Metodiewa 1994; Bains and Shaw 1997; Koppal et al. 1999). Le GSH possède notamment un effet “scavenger” de l’anion superoxyde supérieur à celui de la cystéine et de la N-acétylcystéine (Hussain et al. 1996).

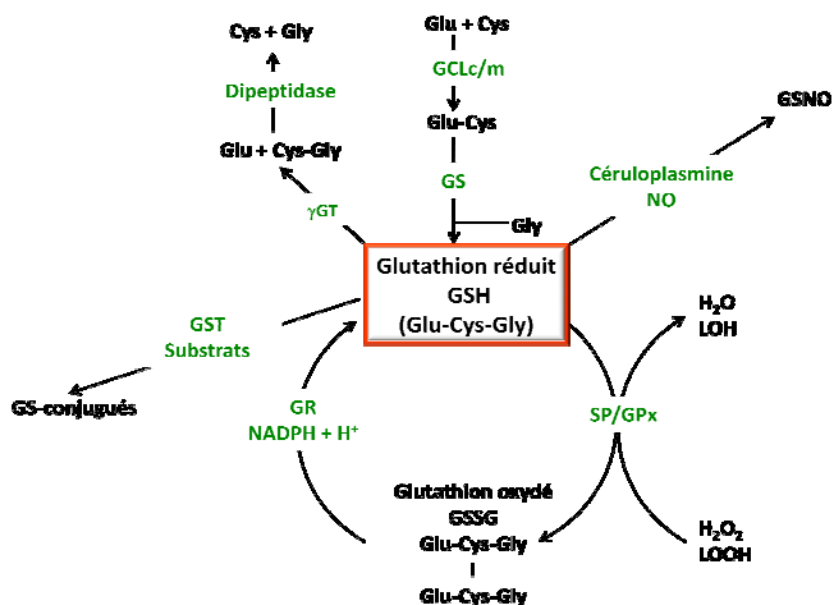


Figure 12 : Voies de régulation de la synthèse et de la régénération du glutathion

Ce schéma permet d’illustrer les différentes voies permettant la synthèse du glutathion, son utilisation et sa régénération ainsi que les différentes enzymes impliquées.

Abréviations : Cys : Cystéine ; Gly : Glycine ; Glu : Glutamate ; GCLC/m : Glutamate cystéine ligase (c : sous-unités catalytique et m : sous-unité modulatrice) ; GS : Glutathion synthétase ; GSNO : S-nitrosoglutathion ; LOH : hydroxyle lipidique ; LOOH : peroxydes lipidiques ; SP : Sélénoprotéine ; GPx : Glutathion peroxydase, GR : Glutathion réductase, NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; GST : Glutathion-S-Transférase ; γ GT : gamma Glutamyltranspeptidase.

Le glutathion agit également et surtout comme co-facteur indispensable pour certaines enzymes comme les glutathion peroxydases (GPx), la sélénoprotéine P, certaines peroxirédoxines et les glutarédoxines (Kalinina et al. 2008). Le glutathion se retrouve alors sous sa forme oxydée GSSG qui pourra être réduite à nouveau par la glutathion réductase (GR) en présence de NADPH. Le ratio glutathion réduit/oxydé est largement en faveur du glutathion réduit, de l’ordre de

100 pour 1 dans les conditions normales. Elle peut descendre jusqu'à des valeurs d'environ 50 pour 1 en conditions de stress (Maher 2005). Ce ratio sert souvent d'indicateur global de l'état rédox de la cellule.

Par ailleurs, le glutathion forme des liaisons disulfures avec les groupements thiols des protéines sous l'action des glutathion S-transférases (GST). Ce mécanisme appelé S-glutathionylation protège les protéines d'oxydations irréversibles et peut également intervenir dans la régulation de leurs fonctions (Giustarini et al. 2004).

De plus le glutathion aurait un rôle neuromodulateur en se liant par son groupement γ -glutamyl aux récepteurs NMDA et en modifiant les réponses neuronales induites par ce récepteur (Janaky et al. 1999). Le glutathion associé au NO ou S-nitrosoglutathion (GSNO) constitue une forme importante de stockage du NO (Singh et al. 1996). Rauhala et al. (1998) ont montré que le GSNO avait un effet neuroprotecteur dans le cerveau lors d'un stress oxydant (Rauhala et al. 1998).

Enfin, il a été montré que la synthèse de glutathion est nécessaire pour l'entrée et la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Poot et al. 1995). Le glutathion pourrait également induire la différenciation neuronale des cellules stromales de la moelle épinière (Sagara and Makino 2008).

2.2.3 Régulation des systèmes antioxydants : rôle de Nrf2

La mise en place et le contrôle des systèmes antioxydants dans la cellule sont en grande partie sous le contrôle de la voie Nrf2/ARE (Nuclear factor E2-related factor 2/Antioxidant response element) qui régule l'expression des gènes codant pour différentes protéines enzymatiques impliquées dans la synthèse (GCL) ou dans l'utilisation du glutathion (GST) ou d'autres enzymes à activité antioxydante.

L'induction des enzymes de protection contre les ERO est contrôlée au niveau transcriptionnel par l'élément de réponse ARE. Cette séquence retrouvée dans le promoteur de différents gènes antioxydants a été initialement décrite dans

le promoteur des gènes codant pour la GSTA2 (glutathione-S-transferase A2) et la NQO1 (NADPH quinone oxidoreductase) (Friling et al. 1990; Favreau and Pickett 1991). Une altération du potentiel rédox de la cellule, suite à une augmentation des ERO ou une diminution des capacités antioxydantes, pourrait représenter un signal d'induction des gènes antioxydants. L'activation de ces gènes via ARE est principalement médiée par le facteur de transcription Nrf2 (Moi et al. 1994). D'abord identifié pour le gène codant la protéine NQO1 (Venugopal and Jaiswal 1996), ce facteur de transcription Nrf2 est impliqué dans l'activation de nombreux autres gènes (Nguyen et al. 2003).

Nrf2 est un membre de la sous-famille *Cap n'collar* (CNC) des protéines bzip qui se caractérisent par un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à l'ADN bien conservés (Motohashi et al. 2002). Nrf2 se lie à l'ADN au niveau de la séquence ARE sous forme d'hétérodimère avec une des petites protéines Maf. L'absence de Nrf2 est associée à une perte de régulation de l'expression de gènes codant pour de nombreuses protéines : protéines de la réponse antioxydante, protéines chaperones, et protéines impliquées dans la protéolyse dépendante de l'ubiquitine, la croissance cellulaire et l'apoptose (McMahon et al. 2001; Lee et al. 2003). L'absence de Nrf2 n'altère pas le développement embryonnaire chez la souris mais provoque une sensibilité accrue au stress oxydant (Enomoto et al. 2001; Yoh et al. 2001; Cho et al. 2002).

L'activité de Nrf2 est régulée en partie par la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), protéine cytoplasmique avec un domaine C-terminal " Kelch " de liaison avec le domaine N-terminal " Neh2 " de Nrf2 (Figure 13) permettant de maintenir le facteur de transcription dans le cytoplasme (Itoh et al. 1999). Ce domaine " Kelch " se lie également aux molécules d'actine et cette liaison semble impliquée dans la séquestration de Nrf2. En effet, il a été démontré que l'altération du cytosquelette d'actine favorisait la translocation de Nrf2 dans le noyau (Kang et al. 2004). Keap1 séquestrerait ainsi Nrf2 dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'aller agir comme facteur de transcription dans le noyau (Figure 13). Mais des études récentes suggèrent un autre mécanisme de répression de Nrf2 : la protéine

Nrf2, très instable (demi-vie 15 min environ), est dégradée par le protéasome après ubiquitinylation par un complexe E3 ligase constitué de plusieurs protéines, dont Keap1 (McMahon et al. 2003; Nguyen et al. 2003; Cullinan et al. 2004; Zhang et al. 2004).

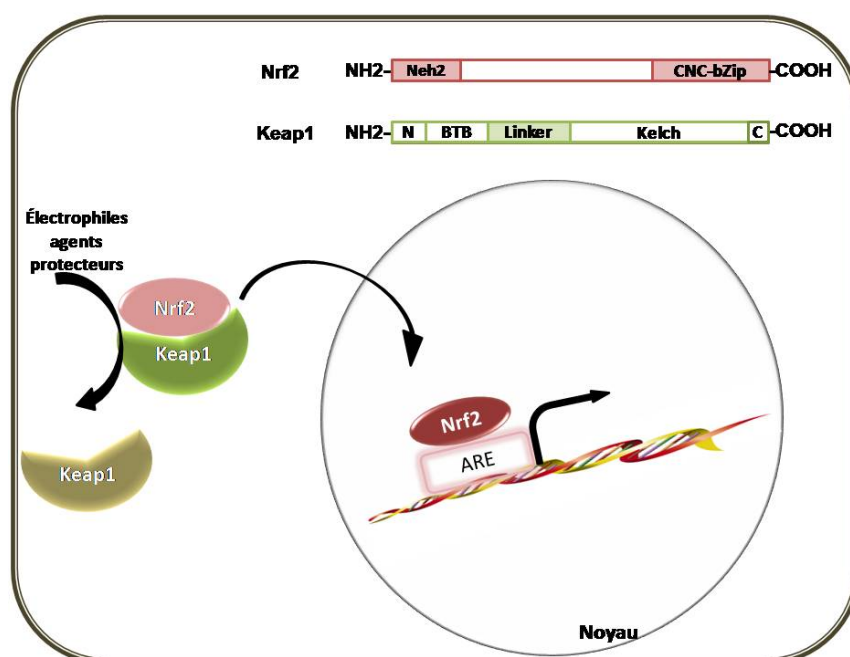


Figure 13 : Schéma simplifié du mécanisme de répression de Nrf2 par Keap2

Dans ce modèle, le mécanisme de répression par Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) consiste à séquestrer Nrf2 (Nuclear factor E2-related factor 2) dans le cytoplasme. L'activation de Nrf2 survient sous l'effet d'électrophiles ou d'autres agents protecteurs qui vont se lier à Keap1 au niveau des résidus cystéine. Suite à cette liaison, Nrf2 est libéré, ce qui va permettre sa translocation dans le noyau. Il y exerce son rôle de facteur de transcription en se fixant à la séquence ARE (Antioxidant response element). En haut à gauche sont représentés les structures des deux protéines Nrf2 et Keap1. On suppose que l'interaction entre les deux protéines se fait au niveau du domaine Neh2 de Nrf2.

Enfin, en réponse à un stress oxydant, l'activité transcriptionnelle de Nrf2 peut être directement augmentée par différentes molécules associées au stress comme les hydroperoxydes lipidiques (Numazawa et al. 2003; Ishii et al. 2004), les lipoprotéines oxydées (Ishii et al. 2004; Anwar et al. 2005) ou encore le monoxyde d'azote (Kang et al. 2002). En dehors du stress oxydant, certains facteurs de

croissance comme le fibroblast growth factor (FGF) ou le keratocyte growth factor (KGF) (Braun et al. 2002; Vargas et al. 2005) peuvent moduler l'activité du facteur Nrf2. Il en est de même pour certains dérivés des prostaglandines, comme la 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (15d-PGJ2) (Itoh et al. 2004; Levonen et al. 2004).

2.3 Stress oxydant et conséquences cellulaires

Face à un stress oxydant, la cellule va subir des altérations marquées de ses constituants majeurs (lipides, protéines, ADN) (Figure 14). La cellule va réagir en augmentant ses capacités antioxydantes (activation de Nrf2, production de glutathion, expression des enzymes antioxydantes par exemple) et ses capacités de réparation (ADN) et/ou d'élimination (protéines) (Berlett and Stadtman 1997). Elle peut également inhiber les voies de production des ERO comme la chaîne respiratoire, le cytochrome P450 et les NADPH oxydases (Morel and Barouki 1999; Barouki and Morel 2001). La survie de la cellule dépend de cette lutte contre le stress oxydant, qui peut la conduire à une mort programmée de type apoptotique et/ou autophagique, voire à une mort nécrotique.

Ces altérations cellulaires induites par le stress oxydant, associées ou non à une mort cellulaire, peuvent être à l'origine de dysfonctionnements tissulaires. C'est le cas dans le vieillissement et dans certaines maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer), cardiovasculaires, endocriniennes (diabète) ou digestives.

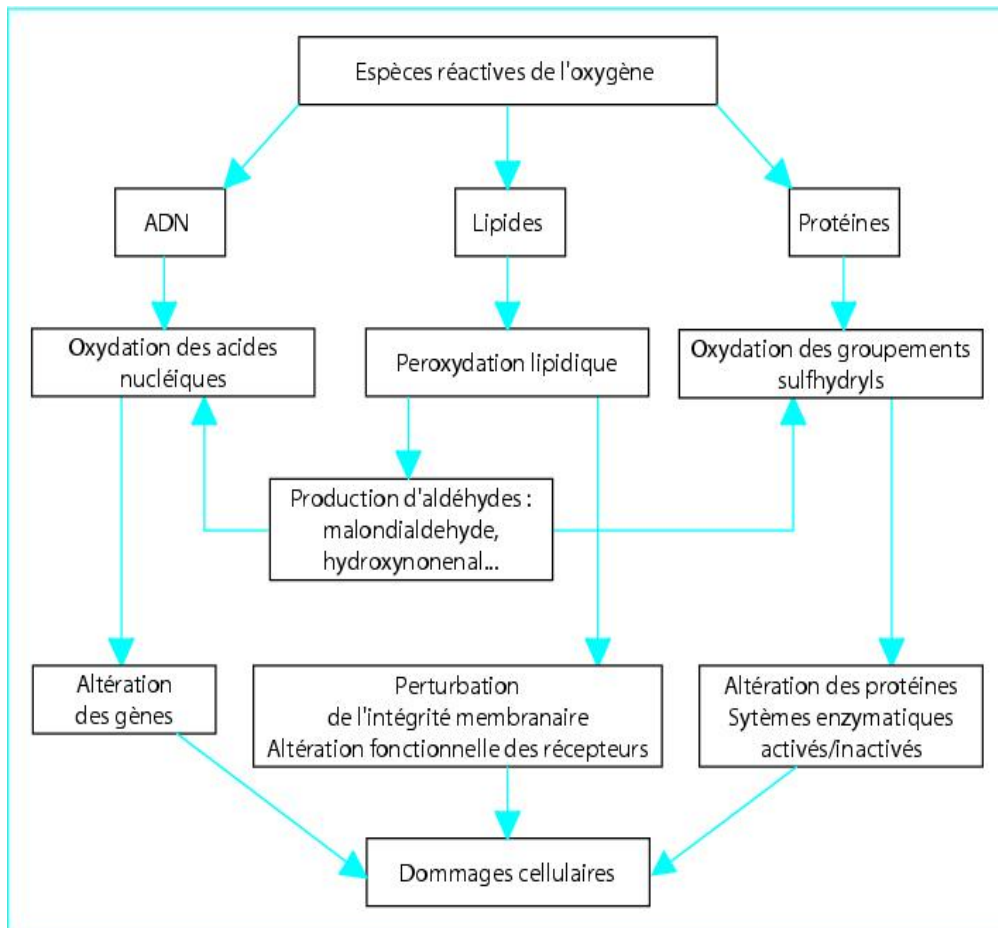


Figure 14 : Altérations des différents constituants de la cellule par les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont des effets néfastes en attaquant les différents constituants de la cellule. Ce schéma montre les conséquences observées suite à une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les altérations induites par les ERO se caractérisent principalement par une peroxydation lipidique, une oxydation des groupements sulfhydryls des protéines et une oxydation des acides nucléique. Ces altérations ont donc pour conséquence majeure une perturbation des membranes et des récepteurs, un dérèglement des systèmes enzymatiques et des altérations génétiques. Monteil et al. 2004

2.3.1 Altération des différents constituants de la cellule

2.3.1.1 La peroxydation lipidique

Une des cibles majeures des ERO sont les lipides, et particulièrement les lipides membranaires. L'oxydation des lipides est initiée et favorisée par des métaux comme le fer et le zinc via la réaction de Fenton. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne, initiée par le transfert d'un atome d'hydrogène d'un lipide membranaire sur les radicaux libres HO° ou O2° (Ercal et al. 2001; Tweeddale et al. 2007). Le radical carboné lipidique, dépourvu de son atome d'hydrogène, va alors réagir avec l'oxygène moléculaire et former un radical peroxy. Ce radical peut lui-même enlever un atome d'hydrogène à un autre acide gras. Cette réaction en chaîne provoque la formation d'hydroxyperoxydes de lipides, composés très peu stables qui sont dégradés en présence de métaux ou de complexes protéines-métaux comme les hémoprotéines (Esterbauer et al. 1992; Marnett 1999). Des aldéhydes très réactifs sont issus de cette dégradation : le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) principalement, le 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) et le malonedialdéhyde (MDA). Ces produits vont réagir avec les résidus lysine, cystéine et histidine des protéines membranaires (Catala 2009). Leurs effets toxiques sont liés *in fine* à l'altération des fonctions de la membrane.

La membrane plasmique est particulièrement touchée par la peroxydation lipidique. La propriété principale d'une membrane plasmique est la fluidité, qui autorise le déplacement des molécules lipidiques dans son plan. Cette fluidité dépend essentiellement de la présence d'acides gras insaturés au sein des phospholipides. Ces acides gras sont particulièrement sensibles aux radicaux libres. Un processus de peroxydation lipidique même modéré peut avoir des conséquences importantes sur les fonctions de la membrane : modifications de la fluidité et de la perméabilité membranaire (perte de perméabilité et du potentiel membranaire), altération du transport d'ions et inactivation des récepteurs et enzymes membranaires (Nigam and Schewe 2000).

2.3.1.2 Oxydation des protéines

Les ERO attaquent directement les acides aminés, particulièrement les acides aminés soufrés et aromatiques. L'oxydation des acides aminés va entraîner des modifications structurales des protéines, ce qui pourrait favoriser leur agrégation ou leur dégradation par des protéases (Squier 2001). Ces altérations peuvent s'accumuler dans les tissus et augmenter avec l'âge, ce qui entraîne une perte de fonction des organes. L'oxydation des acides aminés soufrés en particulier est souvent associée à une perte de groupements thiols, ces groupements étant particulièrement abondants et jouant un rôle majeur dans la fonction des enzymes antioxydantes.

L'oxydation des protéines membranaires peut induire une modification du caractère antigénique ou des propriétés fonctionnelles des protéines (récepteurs, enzymes). Ces protéines deviennent plus sensibles aux protéases et plus hydrophobes. La présence de groupements carbonyles est souvent utilisée comme marqueur de l'oxydation des protéines et du stress oxydant (Chakravarti and Chakravarti 2007).

Une autre voie d'altération protéique induite par le stress oxydant fait intervenir les molécules de glucose oxydées en présence d'ions métalliques. Il en résulte une production d'aldéhydes et d' H_2O_2 . Les aldéhydes entraînent des altérations irréversibles des protéines par glycation (Wolff et al. 1989).

2.3.1.3 Oxydation de l'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque des radicaux de l'oxygène. L'ADN mitochondrial, du fait de sa proximité de l'une des sources majeures des ERO, la chaîne respiratoire mitochondriale, est particulièrement vulnérable (Stevnsner et al. 2002). De plus, le potentiel de réparation de l'ADN mitochondrial est plus faible que celui de l'ADN nucléaire. Le stress oxydant peut provoquer différents types d'altérations au niveau de la molécule d'ADN : cassures simple ou double brin, oxydation des bases puriques et pyrimidiques, pontages ADN-ARN ou

ADN-protéines ou formation de sites abasiques (Beckman and Ames 1997; Henle and Linn 1997). Toutes ces altérations sont illustrées sur le schéma de la figure 15 (Favier 2006). Les attaques des ERO peuvent cibler les bases puriques et pyrimidiques et en particulier la guanine. La 8-hydroxyguanine et la 8-oxoguanine ainsi produites sont utilisées comme marqueur d'oxydation de l'ADN (Hayakawa et al. 1991). La réparation de ces modifications de l'ADN est souvent essentielle à la survie cellulaire et différents mécanismes ont été décrits permettant de corriger les altérations ciblées sur les bases de l'ADN et les ruptures de brins (Croteau and Bohr 1997).

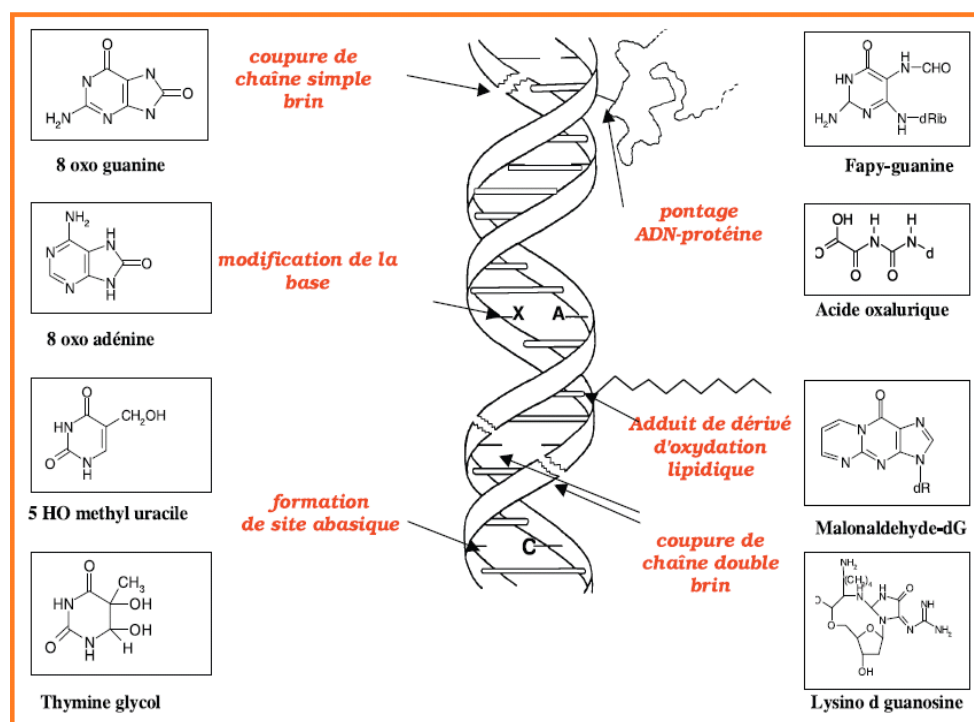


Figure 15 : Lésions de l'ADN formées par l'attaque des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'attaque du double brin d'ADN par les ERO peut engendrer différents types d'altérations : cassures simple ou double brin, oxydation des bases puriques et pyrimidiques, pontages ADN-ARN ou ADN-protéine, adduits de dérivés d'oxydation lipidique ou formation de sites abasiques. D'après Favier, 2006.

2.3.2 Mort cellulaire induite par le stress oxydant

Lorsque les altérations sur les différents constituants cellulaires induites par le stress oxydant sont trop importantes et irréversibles, la cellule va alors entrer dans un processus de mort cellulaire programmée. Il existe plusieurs types de mort cellulaire programmée (Assuncao Guimaraes and Linden 2004; Fink and Cookson 2005), mais la mort apoptotique (Kerr et al. 1972; Hengartner 2000) reste la voie principale impliquée dans le stress oxydant (Chandra et al. 2000). Classiquement la mort apoptotique s'oppose à la mort nécrotique considérée comme une mort cellulaire non programmée (Proskuryakov et al. 2003), avec rupture de la membrane et libération du contenu intracellulaire (Figure 16).

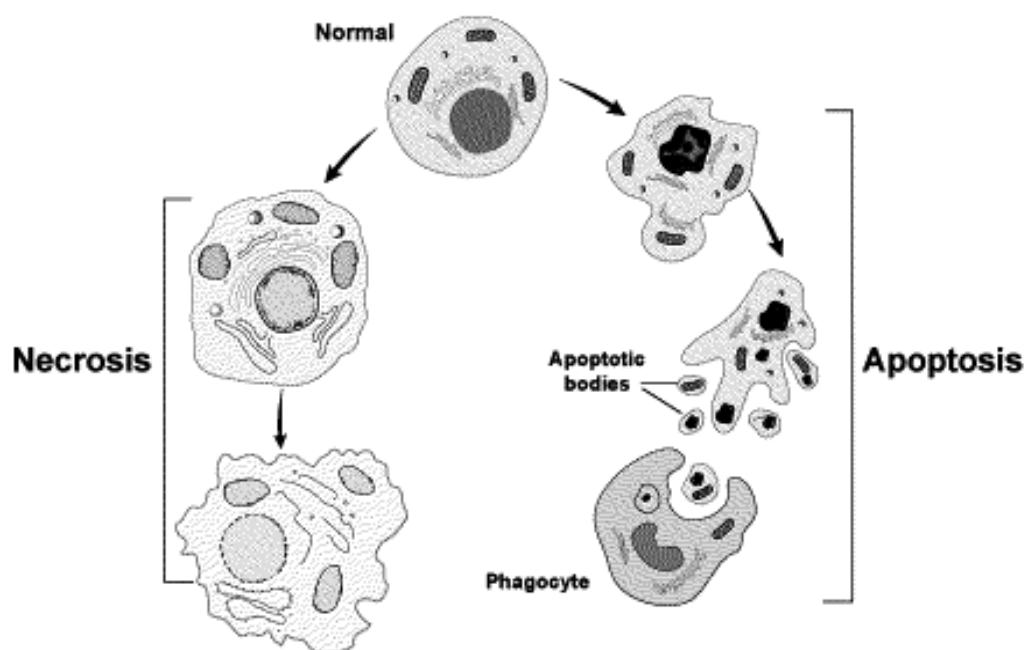


Figure 16 : Différences morphologiques observées au cours de la nécrose et de l'apoptose

La nécrose (necrosis) est caractérisée par une augmentation rapide du volume cellulaire, une perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale, et le relargage du contenu lysosomal, provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Au contraire, l'apoptose (apoptosis) se caractérise par le maintien de l'intégrité membranaire jusque dans les phases tardives du processus et une diminution du volume cellulaire. La structure des organelles est préservée alors que la chromatine se condense et se fragmente. La cellule se fragmente également en corps apoptotiques (apoptotic bodies) mais préserve son contenu lysosomal. D'après Cotran et al. Robbins Pathologic Basis of Disease, 1999.

Au cours du processus apoptotique, la cellule va subir une série de clivages protéolytiques intracellulaires qui vont cibler le cytoplasme puis le noyau, sans que l'intégrité de la membrane plasmique ne soit altérée. Des modifications au niveau du cytosquelette entraînent des changements au niveau de la forme et de la taille de la cellule avec l'apparition de protubérances à sa surface (Kerr et al. 1995). La polarité des phospholipides membranaires est modifiée avec un passage des phosphatidylsérines du feuillet interne au feuillet externe, modification souvent utilisée pour identifier les cellules en apoptose (marquage à l'annexine V). Dans un deuxième temps le noyau se condense et devient pycnotique du fait de la dégradation des protéines de la membrane nucléaire. L'ADN clivé par les endonucléases va générer, selon les cellules, de gros fragments d'ADN ou une échelle d'unités nucléosomiques (fragments d'ADN de 200 pb) (Nagata 2000). L'intégrité membranaire et la rapidité d'élimination cellulaire font qu'une apoptose même massive n'induit pas d'inflammation, contrairement à la nécrose où les différents compartiments cellulaires déversent leur contenu enzymatique au sein des tissus, déclenchant une réponse inflammatoire (Saikumar et al. 1999).

Le processus apoptotique se caractérise par une cascade d'évènements moléculaires et biochimiques dont les mécanismes peuvent être activés par différents signaux extracellulaires ou intracellulaires (Saikumar et al. 1999; Vallette 2001). La voie extrinsèque est activée par des récepteurs membranaires, alors que la voie intrinsèque est initiée dans la mitochondrie. Ces deux voies peuvent co-exister et interagir dans certaines situations (Kurz et al. 2007). Les différentes voies d'activation de l'apoptose sont illustrées dans le schéma de la figure 17, montrant un mécanisme final similaire avec l'activation de la caspase 3.

C'est la voie intrinsèque qui est le plus souvent impliquée lors d'un stress oxydant. En effet, la présence de radicaux libres induit une altération du potentiel de la membrane interne de la mitochondrie, qui engendre une entrée d'eau dans le stroma, un gonflement de la mitochondrie et une altération de la membrane externe. La dysfonction de la membrane externe engendre la sortie de molécules de l'espace inter membranaire comme le cytochrome C et/ou l'AIF (Apoptosis inducing

factor). L'ouverture des canaux de la mitochondrie est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 (Petit et al. 2009). Cette famille est composée de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL et de molécules pro-apoptotiques tels que Bax et Bad (Juin et al. 2005; Lalier et al. 2007). Le cytochrome c libéré va se lier à une protéine cytoplasmique appelée APAF-2 (Apoptotic protease activating factor-2) et le complexe formé peut alors s'associer à la caspase-9 pour former l'apoptosome. L'activation de la caspase 9 par clivage va entraîner à son tour le clivage de la caspase 3 et son activation (Susin et al. 1996). La caspase 3, protéase effectrice de l'apoptose, va elle-même induire le clivage de protéines comme la PARP et conduire à une fragmentation de l'ADN et aux changements morphologiques observés au niveau de la cellule (Janicke et al. 1998). L'AIF également libéré par la mitochondrie va migrer dans le noyau et induire directement une fragmentation de l'ADN (Susin et al. 1999). La libération de ces deux molécules, le cytochrome c et/ou l'AIF, varie en fonction du type cellulaire et du type de stimuli (Cande et al. 2002; Cande et al. 2002).

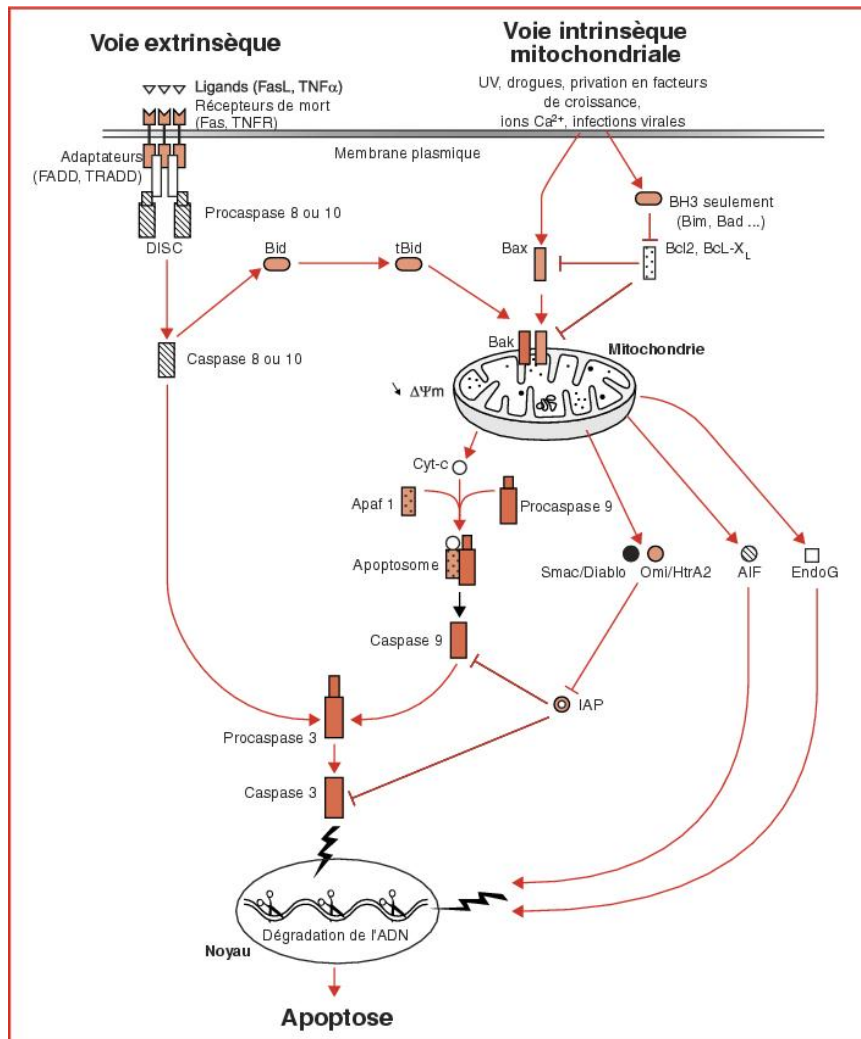


Figure 17 : Voies extrinsèque et intrinsèque d'induction de l'apoptose.

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, tels que Fas et TNFR (tumor necrosis factor receptor), est activée après fixation de leurs ligands respectifs (FasL et TNF α) et formation du complexe DISC (death inducing signalling complex). Ces derniers induisent l'activation des procaspases initiatrices 8 et/ou 10.

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est activée par des stress spécifiques comme certaines infections virales et se caractérise notamment par une dépolarisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome c (Cyt-c) dans le cytosol. Ce dernier s'associe avec la protéine adaptatrice Apaf1 (apoptotic protease-activating factor-1) et la procaspase 9, pour former l'apoptosome. La voie mitochondriale est finement régulée par les protéines de la famille de Bcl2 (B cell lymphoma-2).

Les deux voies aboutissent à l'activation de la procaspase 3 en caspase 3 exécutive, responsable de l'activation d'enzymes qui induisent le clivage nucléotidique. D'après Blondel et al. 2006.

2.4 Stress oxydant dans le SNC

Le stress oxydant est sans aucun doute impliqué dans la progression de nombreuses pathologies chez l'homme, parmi lesquelles les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies inflammatoires et les maladies neurodégénératives (Valko et al. 2007). Le fait que les ERO soient directement à l'origine de certaines de ces maladies est plus discuté. Dans cette analyse bibliographique, l'impact du stress oxydant sur les maladies neurodégénératives sera d'abord abordé, avec une attention spéciale portée sur le rôle des cellules gliales astrocytaires. Le rôle du stress oxydant dans les pathologies digestives, notamment inflammatoires, sera ensuite analysé. Son impact sur les neuropathies entériques et le rôle potentiel des cellules gliales entériques seront étudiés.

2.4.1 Stress oxydant et pathologies neurodégénératives

Le cerveau est un organe particulièrement sensible au stress oxydant. Sa consommation importante d'oxygène sous-entend une production potentiellement élevée d'ERO. De plus, le SNC est très riche en acides gras insaturés cibles de la peroxydation lipidique. Enfin les enzymes antioxydantes telles que les SOD, la catalase et les GPx y sont moins abondantes que dans les autres organes (foie, intestin) (Dringen 2000). Le développement des maladies neurodégénératives est clairement associé au vieillissement. L'augmentation de la fréquence de ces pathologies dans les pays industrialisés est liée à l'augmentation de l'espérance de vie. Le vieillissement est associé au déclin général des défenses antioxydantes, et le cerveau y est sans doute l'un des plus vulnérables.

De nombreuses études ont mis en évidence, dans les cerveaux *post mortem* de patients atteints de maladies neurodégénératives, la présence de différents marqueurs du stress oxydant comme l'oxydation et la nitration des protéines, des lipides et de l'ADN (Marcum et al. 2005; Hald et al. 2007; Qin et al. 2007). La détection de ces marqueurs ne permet pas de déterminer si le stress oxydant joue un rôle primaire et causal ou s'il constitue un phénomène secondaire et tardif. Le

stress oxydant intervient par exemple dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de la sclérose latérale amyotrophique (Rao and Balachandran 2002; Yamashita and Matsumoto 2007; Kamat et al. 2008). Le stress oxydant y constitue un lien entre les facteurs environnementaux (métaux lourds, pesticides, etc.) et les facteurs endogènes et génétiques impliqués dans leur pathogénie.

L'utilisation de modèles expérimentaux reproduisant ces pathologies suggère que le stress oxydant n'est pas seulement la conséquence d'un dysfonctionnement mitochondrial mais qu'il résulte également d'un processus actif de réponse immunitaire non spécifique dans le cerveau. Si l'activation de cette réponse est indispensable à la survie, elle est peut être activée de façon inappropriée et causer la mort des neurones. Le stress oxydant peut par ailleurs avoir des effets indirects en agissant d'abord sur la barrière hémato-encéphalique ou sur les astrocytes, avec des répercussions secondaires sur les corps cellulaires des neurones et leurs prolongements axonaux.

2.4.1.1 Origine et conséquences du stress oxydant dans les pathologies neurodégénératives

Dans les conditions normales, la faible quantité d'ERO produite par la chaîne respiratoire mitochondriale, par différentes oxydases ou par certaines réactions spécifiques (Fenton, Haber-Weiss) ne conduit pas à un stress oxydant. Ces ERO sont probablement indispensables au fonctionnement de la cellule. Cependant au niveau du cerveau, un défaut de fonctionnement mitochondrial, en particulier au niveau du transfert d'électrons, aboutit rapidement à une production excessive d'ERO et à une dégénérescence neuronale (Swerdlow et al. 1996; Fukui and Moraes 2008).

Les maladies neurodégénératives sont souvent associées à la formation d'agrégats de protéines spécifiques (Simonian and Coyle 1996) comme le peptide β -amyloïde et la protéine Tau (maladie d'Alzheimer) ou la protéine α -synucléine (maladie de Parkinson). Les modifications protéiques induites par les ERO et les espèces réactives de l'azote interviennent en modifiant les propriétés de solubilité

et l'agrégabilité des protéines. Ces altérations protéiques, en retour, ont souvent pour conséquence une augmentation de la production d'ERO et l'activation de la microglie constituée de cellules de nature macrophagique. L'activation microgliale est une composante commune aux maladies neurodégénératives et se traduit par un processus inflammatoire, avec libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF α), de prostaglandines (PGE₂), d'ERO et d'espèces réactives de l'azote (monoxyde d'azote et peroxy-nitrite). Ces trois processus d'agrégation protéique, d'activation microgliale et d'inflammation sont particulièrement favorables, en présence d'un niveau élevé de cations métalliques (Fe, Cu et Zn), à la génération d'un stress oxydant et/ou nitrosylant. Les altérations consécutives des constituants cellulaires des neurones initient le processus de neurodégénérescence (Simonian and Coyle 1996; Liu et al. 2002; Valko et al. 2007).

L'identification des mécanismes responsables du stress oxydant d'une part et les conséquences observées sur les composantes cellulaires d'autre part ont permis de mieux comprendre ces différentes pathologies neurodégénératives que sont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la SLA.

2.4.1.2 Stress oxydant et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée à la fois par des dépôts extra-cellulaires de peptide β -amyloïde, formé par la protéolyse de l'APP (Amyloid precursor protein), et par des inclusions intra-neuronale de protéine Tau. Les inclusions de protéines Tau sont les mieux corrélées aux symptômes neurologiques et à la perte neuronale, mais la pathologie amyloïde serait l'initiatrice du processus dégénératif (hypothèse de la cascade) (Duyckaerts et al. 2009).

La dysfonction mitochondriale et le stress oxydant semblent impliqués précocement dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer. Des modifications importantes des constituants neuronaux ont été rapportées comme la glycation des protéines (Advanced glycation end products ou AGEs), la peroxydation lipidique (4-HNE, MAD) et les modifications des bases de l'ADN (8-OHdG) (Markesbery 1999; Mamelak 2007).

La formation des oligomères de peptide β -amyloïde, préalable à leur agrégation, est une étape importante dans l'induction du stress oxydant. Les oligomères peuvent directement générer des ERO en présence d'ions fer ou cuivre (Huang et al. 1999), dont la concentration est augmentée dans les régions cérébrales atteintes. Des radicaux libres sont formés très tôt au cours du processus d'agrégation (Tabner et al. 2005). Les souris transgéniques déficientes pour l'enzyme mitochondriale antioxydante Mn-SOD présentent une exacerbation des dépôts amyloïdes, suggérant que le stress oxydant facilite en retour la production du peptide β -amyloïde (Li et al. 2004), par un effet présumé sur les protéases responsables de sa synthèse à partir de la protéine APP (β -sécrétase ou BACE-1 et γ -sécrétase).

Le stress oxydant pourrait lui-même induire l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, préalable et nécessaire à son agrégation (Melov et al. 2007). Cette phosphorylation provoquerait la dysfonction puis la mort neuronale par la déstabilisation des microtubules. Ainsi le stress oxydant pourrait constituer le lien manquant entre pathologie amyloïde et agrégats de protéine Tau.

2.4.1.3 Stress oxydant et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont situés dans la substance noire (substantia nigra pars compacta ou SNpc) et les axones se projettent dans le striatum où ils libèrent la dopamine. D'autres types de neurones (glutamatergiques, cholinergiques et adrénergiques) présentent également des altérations structurales. L'une des caractéristiques de la maladie de Parkinson est la présence d'agrégats intracellulaires dans les corps neuronaux (corps de Lewy) et/ou dans les axones (neurites de Lewy). Ces agrégats contiennent différentes protéines, l' α -synucléine et l'ubiquitine étant les composants majoritaires (Braak and Del Tredici 2009).

Le stress oxydant participe activement à la neurodégénérescence dopaminergique. Des altérations au niveau des protéines (oxydation et nitration),

des lipides (peroxydation) et de l'ADN (oxydation des bases) ont été observées au niveau de la substance noire chez les patients parkinsoniens (Danielson and Andersen 2008). L'agrégation de l' α -synucléine et la formation des corps de Lewy dépendraient en partie du stress oxydant. La nitration de l' α -synucléine induite par les espèces réactives de l'azote augmente par exemple son agrégabilité (Hodara et al. 2004). La vulnérabilité préférentielle de la substance noire a plusieurs origines potentielles : (1) la dopamine elle-même génère des ERO par auto-oxydation ou par l'action enzymatique de la monoamine oxydase B, avec production d' H_2O_2 , de dopamine quinone et de neuromélanine (Stokes et al. 1999; Chinta and Andersen 2008) ; (2) la concentration physiologiquement élevée en fer dans la substance noire, encore accrue dans la maladie de Parkinson, favorise la transformation de l' H_2O_2 en radical hydroxyle, transformation accélérée par la neuromélanine (Snyder and Connor 2009) ; (3) un niveau faible de glutathion réduit apparaît très tôt et diminue les capacités antioxydantes des neurones (Jenner 2003).

Confortant encore le rôle du stress oxydant, certaines mutations responsables de formes familiales de maladie de Parkinson perturbent directement les défenses antioxydantes de la cellule. Différentes mutations sur le gène codant pour la protéine DJ-1 sont associées à une forme autosomale récessive de la maladie (Bonifati et al. 2003). Or cette protéine est impliquée dans la régulation de la synthèse du glutathion (Zhou and Freed 2005). Enfin comme pour la maladie d'Alzheimer, la composante environnementale pro-oxydante est également importante dans l'évolution de la dégénérescence neuronale observée dans la maladie de Parkinson, qu'elle soit associée ou non à une composante génétique.

2.4.1.4 Stress oxydant et sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Cette maladie est caractérisée par une perte des motoneurones au niveau de la moelle épinière et du cerveau (Wijesekera and Leigh 2009). Des mutations au niveau de la superoxyde dismutase (SOD-1) cytosolique et dépendante du Cu/Zn ont été identifiées dans certains cas familiaux (Rosen 1993), sans établir formellement si ces mutations entraînent un gain ou une perte de fonction. Cette

enzyme est directement impliquée dans l'élimination des anions superoxydes, la production d' H_2O_2 et la régulation du stress oxydant. De plus, une plus grande disponibilité en cations métalliques Cu/Zn pourrait accélérer la production de radicaux hydroxyles à partir de l' H_2O_2 (réaction de Fenton) ou des anions superoxydes (réaction d'Haber-Weiss). Enfin, une production augmentée d'anions peroxytrites à partir des anions superoxydes et du NO, pourrait expliquer la nitration (nitro-tyrosine) des neurofilaments retrouvés dans des agrégats avec l'ubiquitine (Barber et al. 2006).

Cette analyse sur les maladies neurodégénératives et les relations avec le stress oxydant s'est principalement focalisée sur la population neuronale. Toutefois, la population gliale astrocytaire est concernée au premier plan. Les astrocytes interviennent d'une part dans la défense contre le stress oxydant, mais la dysfonction des astrocytes qui peut résulter peut induire d'autre part une prolifération excessive et une activation gliale aggravant le phénomène.

2.4.2 Neurodégénérescence et rôle des cellules gliales astrocytaires

2.4.2.1 Les cellules gliales astrocytaires ou astrocytes

Les cellules gliales représentent 90% des cellules au sein du système nerveux central. Contrairement aux cellules neuronales, elles gardent leur potentiel de renouvellement à l'âge adulte. Les cellules gliales regroupent trois différentes populations qui ont des propriétés et des fonctions bien distinctes : les oligodendrocytes, la microglie et les astrocytes. Alors que le rôle des oligodendrocytes dans myélinisation des axones et celui de la microglie dans la fonction phagocytaire sont bien établis, les astrocytes ont longtemps été considérés comme de simples cellules de " support " au sein du système nerveux (Figure 18). Les connaissances sur les fonctions des astrocytes ont clairement évolué ces dernières années avec la mise en évidence de leur rôle dans le contrôle des fonctions synaptiques, du flux sanguin, de la neurogénèse et de la survie neuronale (Jessen 2004; Volterra and Meldolesi 2005).

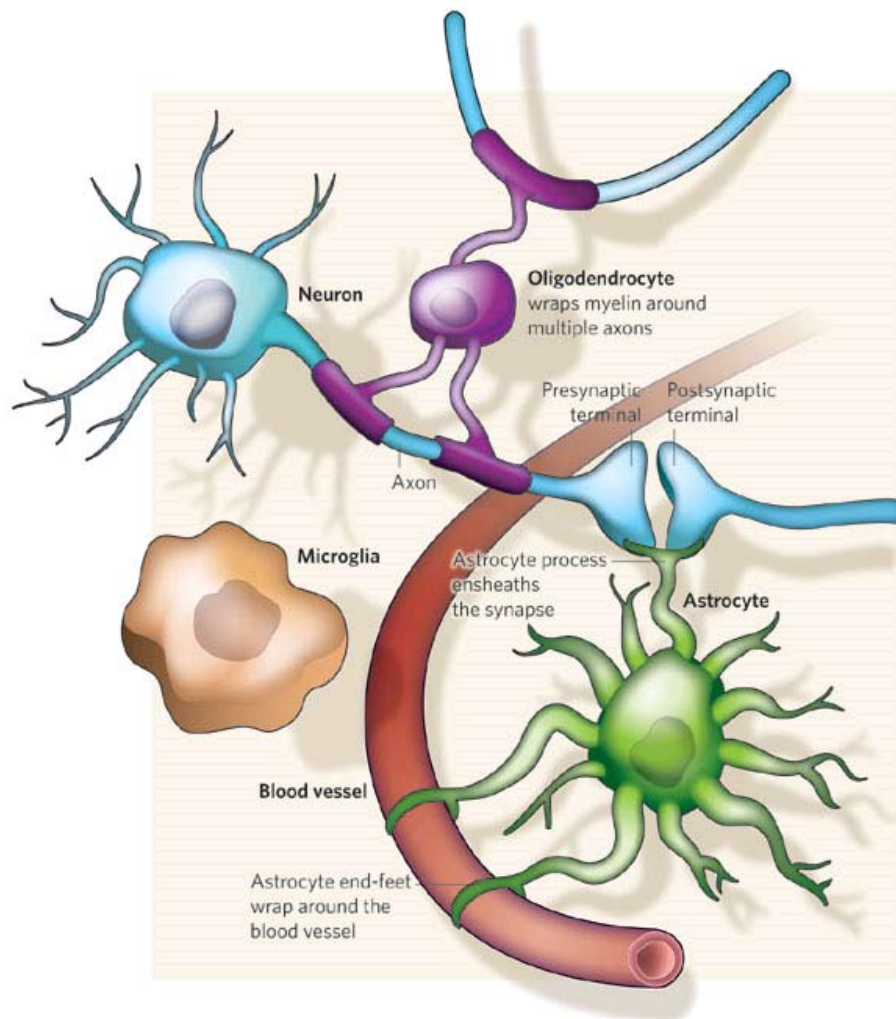


Figure 18 : Schéma représentant les différents types de cellules gliales

On observe sur ce schéma les différents types de cellules gliales interagissant avec les neurones et les vaisseaux sanguins avoisinants. Les oligodendrocytes (en violet) produisent la myéline qui entoure les prolongements axonaux et permet d'augmenter la vitesse de la transmission neuronale. Les astrocytes (en vert) présentent des extensions qui entourent les vaisseaux sanguins et les synapses. Les astrocytes sont responsable du contrôle des fonctions neuronales et des fonctions de la barrière hémato-encéphalique. La microglie (en orange), d'origine macrophagique, sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central. D'après Allen et Barres, 2009.

2.4.2.2 Les astrocytes et le contrôle des fonctions neuronales

Les astrocytes peuvent être divisés en deux classes en fonction de leur morphologie et leur localisation. On distingue les astrocytes protoplasmiques, retrouvés dans la substance grise, avec des extensions qui entourent les synapses et

les vaisseaux sanguins, et les astrocytes fibreux localisés dans la substance blanche et au contact des nœuds de Ranvier et des vaisseaux sanguins. Une seule cellule astrocytaire projette environ un millier d'extensions très fines qui vont couvrir les synapses et les vaisseaux sanguins (Ventura and Harris 1999; Bushong et al. 2002; Barres 2008).

Une des premières fonctions attribuée aux astrocytes est celle de cellules "nourricières". Leur position stratégique entre les neurones et les capillaires sanguins et leur équipement enzymatique impliqué dans le métabolisme des acides aminés, de la taurine et des glucides leur permettent d'assumer ce rôle. Cet équipement enzymatique est peu exprimé dans les neurones, engendrant une compartimentation de certaines voies métaboliques entre neurones et astrocytes (Kirchhoff et al. 2001). Parmi les enzymes spécifiquement astrocytaires, on relève la glutamine synthase impliquée dans le cycle glutamine/glutamate (Norenberg and Martinez-Hernandez 1979), la pyruvate carboxylase responsable de la synthèse d'oxaloacétate (Shank et al. 1985), et la glycogène phosphorylase impliquée dans la mobilisation du glycogène (Reinhart et al. 1990). Les molécules produites seront utilisées par les neurones comme sources d'énergie (lactate, glucose), comme neurotransmetteurs (glutamate) ou comme précurseurs pour la synthèse de glutathion (à partir du glutamate, de la cystéine, et de la glycine) (Dringen et al. 1993).

Les astrocytes sont également impliqués dans la régulation des fonctions synaptiques. Ils peuvent contrôler la synaptogénèse via la thrombospondine (Pfrieger and Barres 1997; Christopherson et al. 2005) ou la transmission synaptique via des ondes calciques associées à la libération de glutamate et d'ATP (Verkhratsky et al. 1998; Kirchhoff et al. 2001; Newman 2003; Wang et al. 2006; Agulhon et al. 2008). Plus récemment, il a été montré que la libération de D-sérine par les astrocytes était un élément important dans le fonctionnement du système hypothalamo-neurohypophysaire (Panatier 2009).

Par ailleurs, La mise en évidence de jonctions communicantes (connexine 43) entre les astrocytes apparaît bien en faveur de l'existence d'un véritable réseau ou " réticulum " astrocytaire situé entre les neurones et les vaisseaux sanguins (Houades et al. 2006). Ces jonctions semblent également impliquées dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer, caractérisée par une surexpression de la connexine 43 (Nagy et al. 1996). Enfin, une des fonctions très importante des astrocytes vis-à-vis des neurones est certainement leur capacité de neuroprotection, en particulier dans des situations de stress oxydant.

2.4.2.3 Le rôle neuroprotecteur des astrocytes

Comme cela a déjà été mentionné précédemment, les neurones sont particulièrement sensibles et exposés au stress oxydant. L'exposition au stress oxydant peut être directe à partir des ERO (anion $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , radical OH^{\cdot}) (Schulz et al. 2000) ou des espèces réactives de l'azote (monoxyde d'azote, peroxydrite) (Almeida et al. 2001; Gegg et al. 2003) ; elle peut se faire indirectement par des concentrations élevées de glutamate, générant un phénomène d'excitotoxicité (Novelli et al. 1988; Arundine and Tymianski 2004) ou " toxicité oxydative du glutamate " (Murphy et al. 1989; Cho and Bannai 1990; Chen et al. 2000).

Les astrocytes participent à la neuroprotection en utilisant différentes voies.

(i) La production et la sécrétion du glutathion par les astrocytes constituent une voie primordiale de neuroprotection (Dringen 2000). La membrane des astrocytes possède le tranporteur du glutathion MRP1 ou « Multidrug Resistance Protein 1 » (Minich et al. 2006) et la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT). La γ -GT permet un clivage partiel du glutathion sécrété. Le dipeptide cys-gly formé est ensuite clivé par une aminopeptidase N de la membrane neuronale. Les différents acides aminés issus du métabolisme du glutathion (glu, cys et gly) peuvent être captés par les neurones et servir de substrats pour la synthèse de glutathion dans les neurones. Le glutathion pourrait également agir directement au niveau du microenvironnement neuronal en servant de substrat pour des sélénoprotéines sécrétées (GPx3 et sélénoprotéine P) (Chu et al. 1992; Yang et al. 2000). Ces enzymes peuvent éliminer

l' H_2O_2 ou agir sur les hydroperoxydes lipidiques membranaires (Yamamoto and Takahashi 1993; Burk and Hill 2005).

(ii) Les astrocytes participent activement à l'élimination du glutamate sécrété par les neurones, réduisant ainsi les risques d'excitotoxicité. L'entrée du glutamate s'effectue par des transporteurs spécifiques (Clements et al. 1992; Bergles and Jahr 1998) et modifie indirectement le métabolisme des astrocytes (Chatton et al. 2000). Le glutamate est également transformé en glutamine grâce à la glutamine synthétase. La glutamine astrocytaire pourra être exportée et de nouveau utilisée par les neurones.

(iii) Les astrocytes peuvent libérer des facteurs neurotrophiques qui augmentent la survie des neurones (Hailer et al. 2001). Plusieurs d'entre eux ont été identifiés à partir de milieu conditionné provenant de cultures astrocytaires : le NGF, le BDNF (Bone Derived Growth Factor), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) et le GDNF (Bruno et al. 2001; Mizuta et al. 2001). Les astrocytes peuvent également sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et $TGF\beta$) et des chémokines (RANTES). Ces facteurs neurotrophiques assurent la survie et la prolifération des neurones mais aussi des astrocytes eux-mêmes (Bakhiet et al. 2001; Albrecht et al. 2002).

Si beaucoup d'arguments plaident en faveur des effets neuroprotecteurs des astrocytes, il ne faut pas exclure que ces mêmes cellules, dans certaines conditions, puissent avoir des effets néfastes sur les neurones et conduire à une neurodégénérescence. Dans certaines situations inflammatoires à la suite de lésions cérébrales, les astrocytes deviennent « réactifs » (Reier and Houle 1988). Il en résulte une hyperplasie et une hypertrophie cellulaire (gliose astrocytaire) et une libération excessive de facteurs neurotrophiques et de constituants de la matrice extracellulaire (Little and O'Callaghan 2001; Barres 2008).

3 Neuropathies digestives et rôle des cellules gliales entériques

3.1 Les neuropathies entériques

Le concept de neuropathie entérique est une notion récente regroupant un ensemble encore mal délimité de pathologies digestives associées à une atteinte du SNE. Ce terme peut donc désigner différents types de maladies comme certaines maladies d'origine génétique ou développementale, des maladies inflammatoires, des mitochondriopathies, des maladies associées à des troubles du codage neurochimique ou des maladies neurodégénératives (De Giorgio and Camilleri 2004).

On distingue d'abord des pathologies associées à une perte des neurones entériques. La maladie de Hirschprung est caractérisée par une absence totale des ganglions entériques (aganglionose) au niveau du côlon distal. Cette aganglionose est due à un défaut de migration des cellules de la crête neurale (voir chapitre 1.2) (Heanue and Pachnis 2007). D'autres pathologies sont associées à une perte sélective de certains neurones entériques. L'achalasie touche particulièrement l'œsophage et se caractérise par la disparition des neurones inhibiteurs nitreurgiques et VIPergiques au niveau de l'œsophage et du sphincter inférieur de l'œsophage (Aggestrup et al. 1983; Mearin et al. 1993), induisant un trouble du péristaltisme (De Giorgio et al. 1999; Di Nardo et al. 2008). Une dégénérescence des neurones entériques est également observée dans d'autres pathologies comme la pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC), la constipation sévère ou la gastroparésie (Di Nardo et al. 2008). Cette dégénérescence neuronale entérique était associée à une perte de neurones et/ou la présence de marqueurs de souffrance neuronale notamment de mort apoptotique (Bassotti et al. 2006).

Les maladies inflammatoires de l'intestin (aiguës ou chroniques) représentent un groupe important de pathologies digestives avec des atteintes plus ou moins prononcées du SNE (De Giorgio and Camilleri 2004). Ces atteintes concernent à la

fois les neurones et les cellules gliales entériques (Savidge et al. 2007) avec des situations de mort neuronale entérique clairement identifiées (Tornblom et al. 2002; De Giorgio et al. 2003).

Par ailleurs, le concept de neuropathie entérique peut intégrer des pathologies extra-digestives ; au cours du diabète par exemple une dégénérescence du SNE peut survenir (Chandrasekharan and Srinivasan 2007). Des pathologies neurodégénératives qui touchent principalement le SNC peuvent également comporter une atteinte des neurones entériques. Dans la maladie de Parkinson, des corps de Lewy (voir section 2.6.2) sont observés au niveau des plexus myentérique et sous-muqueux (Wakabayashi et al. 1990), ainsi qu'une diminution du nombre de neurones dopaminergiques (immunoréactifs à la dopamine) dans le côlon (Singaram et al. 1995).

3.2 Implication du stress oxydant au cours des pathologies digestives

Le stress oxydant est omniprésent dans les neuropathies entériques mais son implication n'est pas encore bien définie. Une production massive d'ERO est associée à la majorité des pathologies digestives et en particulier les maladies inflammatoires intestinales (Simmonds and Rampton 1993; Roessner et al. 2008). Ces ERO peuvent être d'origine luminale, après ingestion de certains aliments contenant des hydroperoxydes lipidiques (Aw 1999) des substances toxiques. En conditions pathologiques, elles sont également produites en grandes quantités dans les infections bactériennes et lors des réponses inflammatoires par les leucocytes activés. Un exemple de production massive d'ERO par la xanthine oxydase est observé dans le contexte d'ischémie/reperfusion associé à une situation inflammatoire et impliquant la xanthine oxydase (van der Vliet and Bast 1992). Cette production massive conduit à une altération des composants cellulaires de la BEI, à une perturbation des fonctions de sécrétion et *in fine* à une diarrhée (Sugi et al. 2001; Pavlick et al. 2002). La production d'ERO associée au stress oxydant semble jouer un rôle primordial dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

(MICI). Dans la rectocolite hémorragique en particulier des taux très élevés d'ERO ont été détectés (Simmonds and Rampton 1993; Pavlick et al. 2002; Keshavarzian et al. 2003). Il a également été rapporté une diminution importante des capacités antioxydantes (glutathion et superoxyde dismutase) au niveau de la muqueuse colique chez des patients atteints de MICI (Inauen et al. 1988; Verspaget et al. 1988; Buffinton and Doe 1995; Lih-Brody et al. 1996).

3.2.1 Altération des fonctions neuronales par le stress oxydant

L'effet des ERO sur le SNE a été très peu abordé. Quelques études ont montré une modulation des propriétés physiologiques des neurones entériques par certaines ERO. L'une de ces études a montré que les ERO produits par la xanthine oxydase induisaient une hyperpolarisation suivie par une dépolarisation prolongée des neurones myentériques de type AH chez le rat (Wada-Takahashi and Tamura 2000). Une autre étude effectuée sur des cultures primaires de neurones entériques provenant d'intestins de cobaye a montré une altération de l'excitabilité de ces neurones en présence de H_2O_2 à forte dose ($> 1mM$). Cette altération touchait particulièrement les neurones de type AH, qui présentaient une hyperpolarisation suivie par une dépolarisation irréversible ; l'addition d'antioxydants (catalase, glutathion) prévenait cet effet de l' H_2O_2 (Vogalis and Harvey 2003). Enfin une étude publiée récemment a confirmé les effets délétères du H_2O_2 sur l'excitabilité des neurones myentériques *ex vivo* et a montré que ces effets étaient associés à une augmentation du calcium intracellulaire. L' H_2O_2 provoquait une altération du potentiel de membrane des neurones et une inhibition des courants Na^+ (Pouokam et al. 2009). Enfin, il semblerait que les effets de l' H_2O_2 sont médiés en partie par le radical hydroxyl OH^\cdot produit par la réaction de Fenton en présence d'ions ferreux (Pouokam et al. 2009).

3.2.2 Neurodégénérescence induite par le stress oxydant

Concernant l'effet neurotoxique des ERO, une étude récente a montré que la dégénérescence des neurones myentériques survenant au cours du vieillissement

est associée à une augmentation de la production d'ERO au sein du SNE (Thrasivoulou et al. 2006). Les auteurs ont également montré que les animaux soumis à une restriction alimentaire présentaient une réduction de cette neurodégénérescence. Cet effet neuroprotecteur serait dû à la production de facteurs neurotrophiques comme le GDNF.

Par ailleurs, une étude publiée récemment a montré que l'H₂O₂ induisait une dégénérescence des neurones entériques (altérations morphologiques et diminution significative du nombre de neurones et d'axones) dans un modèle de culture de SNE. La mort induite par l'H₂O₂ était de nature nécrotique et apoptotique indépendante de la caspase 3 et, contrairement aux autres neurotoxines utilisées dans l'article, les effets observés paraissaient irréversibles (Lourenssen et al. 2009).

L'exemple du diabète illustre enfin parfaitement la dégénérescence du SNE associée au stress oxydant (Chandrasekharan and Srinivasan 2007). Les études effectuées sur des modèles de rats diabétiques montrent une modulation de l'activité des enzymes anti-oxydantes : augmentation de l'activité Glutathion-S-transférase (GST) (Giron et al. 1999), altération de l'activité de la GPx1, augmentation de l'activité de la SOD et de la catalase. Cette modulation est contemporaine d'une augmentation du taux de malonaldéhyde, marqueur de peroxydation lipidique (Bhor et al. 2004).

3.3 Rôle des cellules gliales entériques

3.3.1 Altération des cellules gliales au cours des pathologies digestives

De nombreuses études ont montré une altération du réseau glial au cours de pathologies digestives diverses, avec une disparition ou une baisse d'expression des marqueurs gliaux en immunohistochimie. Cependant, l'implication fonctionnelle de ces altérations n'a pas été caractérisée. L'ensemble des atteintes gliales et neuronales observées dans différentes pathologies est résumé dans le tableau II.

Des altérations variables des CGE sont associées aux pathologies inflammatoires. Une disparition des marqueurs gliaux a été montrée dans la maladie de Crohn ou l'entérocolite nécrosante (Wedel et al. 1998; Cornet et al. 2001). Les altérations gliales de la maladie de Crohn ont été observées en zones non inflammées et de façon intéressante, il a été montré au cours de cette pathologie que les CGE exprimaient le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de type II et interagissaient d'une façon active avec les lymphocytes activés (Geboes et al. 1992). Ceci suggère que les CGE jouent dans ce contexte le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. De plus, la capacité des CGE à être infectées par l'agent infectieux impliqué dans la maladie de Crohn, *Mycobacterium avium* sous-espèce *paratuberculosis*, renforce leur rôle potentiel dans l'étiopathologie de la maladie (Chamberlin et al. 2001; Sechi et al. 2007).

Une diminution des marqueurs gliaux S100 β et GFAP a été observée au cours de pathologies de la motricité digestive comme la diverticulose colique ou la constipation (Bassotti et al. 2005; Bassotti et al. 2006). Une altération des CGE a également été reportée dans des pathologies digestives d'origine infectieuse. Ainsi, une étude récente a objectivé une diminution de la population gliale chez les patients atteints de la maladie de Chagas (infection parasitaire causée par le *Trypanosoma cruzi*) et présentant un mégacolon (da Silveira et al. 2009). Une autre étude récente a montré l'infection spécifique des CGE par le JC virus, un polyomavirus qui infecte la population gliale du SNC. Cette étude a montré la présence de JC virus dans les CGE chez 70% des patients atteints de pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) (Selgrad et al. 2009). La présence de JC virus chez 70% des patients atteints de pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) et chez aucun témoin laisse supposer un rôle étiologique de cet agent viral (Selgrad et al. 2009).

Pathologie	Neurones entériques	Cellules gliales entériques (CGE)
Maladie de Crohn	Plasticité neurochimique mort neuronale	↘ Expression GFAP dans la muqueuse non inflammée ↗ Expression CMH II
Colite ulcéral	Plasticité neurochimique mort neuronale	↗ Expression GFAP dans la muqueuse non inflammée ↗ Expression CMH II
Entérocolite nécrosante	neurodégénérescence	↘ Expression GFAP
Diabète	↘ Expression nNOS mort neuronale	Non déterminé
Atrésie	Diminution de la densité neuronale	↘ Expression GFAP
Intestinal slow transit constipation	Plasticité neurochimique	↘ Nombre CGE S100-positives
Maladie de Chagas	Perte massive dans les régions dilatées (mégacôlon, mégaœsophage)	↘ expression S100 préalable à la destruction neuronale

Tableau II Altération des fonctions neuronales et gliales au cours des pathologies digestives

Abréviations : GFAP : Glial fibrillary acidic protein; CMH II: Complexe majeur d'histocompatibilité e classe II ; nNOS : Nitric oxide synthase neuronale, CGE : Cellules gliales entériques. D'après Savidge et al 2007.

3.3.2 Déplétion des cellules gliales entériques dans des modèles expérimentaux

L'implication directe des CGE dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales a pu être réalisée grâce à la mise en place de différents modèles d'ablation des CGE *in vivo* et *in vitro*. Ces modèles ont ainsi permis de reproduire les altérations de la population gliale observée au cours des différentes pathologies citées précédemment.

Le premier modèle est un modèle de souris transgénique exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV-TK) sous contrôle du promoteur de la

GFAP. Un traitement au ganciclovir aboutit à la destruction spécifique des CGE. Le ganciclovir est en effet transformé par la thymidine kinase virale en analogues toxiques de bases puriques (Bush et al. 1998). Les auteurs ont ainsi observé une perte massive des CGE au niveau du jéjunum et de l'iléon et des altérations morphologiques des CGE restantes, détectables dès 6 jours de traitement. Ces souris développent une jéjuno-iléitis fulminante au 11^{ème} jour et meurent au 19^{ème} jour.

Le deuxième modèle est également un modèle de souris transgénique aboutissant à une destruction plus modérée des CGE (Aube et al. 2006). Ce modèle a été adapté à partir d'un premier modèle double transgénique développé en 2001, qui induisait une destruction massive des CGE (Cornet et al. 2001). Le premier modèle a été mis en place en croisant des souris transgéniques exprimant l'hémagglutinine (HA) sous le contrôle de la GFAP avec des souris exprimant un récepteur à l'HA à la surface de leurs lymphocytes. Les auteurs ont ainsi obtenu des souris doublement transgéniques dont les CGE sont totalement détruites suite à la reconnaissance de l'HA par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques exprimant les récepteurs spécifiques. Ces souris meurent au 4^{ème} jour après avoir développé une entérocolite fulminante. Ce modèle a été ensuite adapté en injectant aux souris transgéniques exprimant l'HA sous le contrôle de la GFAP des quantités définies de lymphocytes T CD8+ dirigés contre l'HA, autorisant la destruction spécifique et contrôlée des CGE (Aube et al. 2006).

Le troisième modèle est basé sur l'utilisation d'un agent toxique ciblant les CGE, le fluorocitrate. Le fluorocitrate ne détruit pas les CGE mais inhibe leur métabolisme mitochondrial en inhibant l'activité de l'aconitase, une enzyme-clef du cycle de Krebs (Nasser et al. 2006). Cette molécule aurait un effet inhibiteur préférentiel sur les astrocytes du SNC (Hassel et al. 1992). Suite à l'injection intrapéritonéale du fluorocitrate pendant 7 jours, une diminution spécifique de la capture de dipeptides par les CGE a été observée. Par contre, les auteurs n'ont observé aucune modification morphologique et aucune diminution du nombre des CGE chez les animaux traités.

La mise en place de ces différents modèles d'ablation de la glie a permis d'évaluer les conséquences de cette ablation sur les différentes structures et fonctions du tube digestif.

Les répercussions de la perte des CGE sur le SNE varient énormément selon le caractère total ou partiel de l'ablation gliale. Ainsi la perte totale de CGE obtenue dans le modèle transgénique de Bush et al. induisait une dégénérescence massive des neurones entériques (Bush et al. 1998). Cet effet confirme le rôle des CGE dans le contrôle de la survie neuronale. A l'inverse, la destruction modérée et non inflammatoire réalisée dans le modèle d'Aubé et al. induisait une modification du codage neurochimique au sein du SNE (Aube et al. 2006), avec une perte des neurones VIPergiques dans le plexus sous-muqueux et une diminution de la proportion de neurones nitrergiques dans le plexus myentérique. Enfin, l'utilisation du gliotoxique fluorocitrate par Nasser et al n'induisait aucune modification au sein du SNE, cohérente avec l'absence de réelle destruction des CGE dans ce modèle (Nasser et al. 2006).

L'ablation des CGE se traduit également par des conséquences sur les différentes fonctions digestives, comme la motricité digestive et les fonctions de la BEI. En effet, des altérations de la motricité digestive sont observées suite à l'ablation modérée de CGE dans les modèles d'Aubé et al. et de Nasser et al. Une altération du transit intestinal (Aube et al. 2006; Nasser et al. 2006) et de la vidange gastrique (Aube et al. 2006) est observée, sans modification du transit colique (Nasser et al. 2006). La diminution de la proportion de neurones nitrergiques observée dans le modèle d'Aubé et al permet d'expliquer en partie ces altérations de la motricité (Aube et al. 2006).

Enfin, l'ablation des CGE a des effets délétères sur les fonctions de la BEI. Dans les modèles d'ablation sévère ou modérée une augmentation de la perméabilité intestinale était observée, associée à une inflammation intestinale aiguë si l'ablation était sévère (Savidge et al. 2007). Cette augmentation de la

perméabilité était associée à une augmentation de perméabilité vasculaire dans la muqueuse intestinale (Bush et al. 1998; Cornet et al. 2001; Aube et al. 2006).

3.3.3 Médiateurs gliaux et neuroprotection

Les CGE produisent et sécrètent différents types de molécules actives qui vont moduler les fonctions neuronales. On distingue principalement des facteurs neurotrophiques comme le GDNF, le NGF (Nerve growth factor), la neurotrophine-3, mais aussi des cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6,) et le TGF- β (Transforming growth factor beta) (Hoehner et al. 1996; Bar et al. 1997; Carlson et al. 1999; Ruhl et al. 2001; von Boyen et al. 2006; Neunlist et al. 2007). Ces médiateurs gliaux peuvent être impliqués dans le contrôle de différentes fonctions comme le développement du SNE, la croissance et la différenciation des neurones entériques. Différentes études ont mis en évidence le rôle protecteur de certains de ces médiateurs. Le GDNF protège par exemple les neurones entériques contre le stress oxydant induit par l'hyperglycémie (Anitha et al. 2006; Anitha et al. 2006). Le TGF β produit par les astrocytes a un effet protecteur contre le stress nitrosylant (Dhandapani et al. 2003).

D'autres molécules sécrétées par les CGE ont été récemment identifiées, comme le glutathion sous sa forme réduite (GSH) et sa forme nitrosylée (GSNO) (Savidge et al. 2007). Comme décrit précédemment, le glutathion est un tripeptide reconnu pour ses propriétés antioxydantes et son rôle dans la neuroprotection par les astrocytes (Bains and Shaw 1997; Dringen et al. 2000). La plupart de ces propriétés concernent la forme réduite (GSH). Néanmoins le rôle neuroprotecteur du GSNO a été montré dans le système nerveux central (Rauhala et al. 1998). Enfin, la prostaglandine 15d-PGJ₂ a été identifiée au sein du laboratoire comme étant produite et sécrétée par les CGE (Bach-Ngohou et al, en préparation). Cette molécule a également fait l'objet de nombreuses études qui ont mis en évidence ses capacités protectrices au niveau du SNC (Lin et al. 2006) mais aussi au niveau du TD dans un modèle d'ischémie (Cuzzocrea et al. 2003). Cependant, un effet

neuroprotecteur direct de cette molécule sur les neurones entériques reste à établir.

3.3.4 La 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂)

La 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ ou 15d-PGJ₂ appartient à la famille des prostaglandines (PG). Les PG sont des molécules dérivées de l'acide arachidonique (oméga-6) et appartiennent à la famille des eicosanoïdes. Les prostaglandines ont été isolées pour la première fois et de façon indépendante par von Euler et Goldblatt, en 1935, dans le liquide séminal (Goldblatt 1935; von Euler 1936).

La 15d-PGJ₂ possède des propriétés biologiques différentes des autres PGs. Cette particularité est due à la présence des groupements électrophiles qui vont réagir avec des composés nucléophiles cellulaires comme les groupements thiols des cystéines (Figure 19).

3.3.4.1 Voies de synthèse de la 15d-PGJ₂

La voie de synthèse de la 15d-PGJ₂ est illustrée dans la figure 19 (Kim and Surh 2006). La première étape dans cette synthèse est la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A₂. L'acide arachidonique est transformé en PGG₂ puis en PGH₂ par les activités cyclooxygénase et peroxydase des cyclooxygénases COX-1 et COX-2 (connues aussi sous le nom de PGH₂ synthases -1 et -2) (Ueno et al. 2001). La PGH₂ est une molécule instable qui va être transformée enzymatiquement pour donner naissance à une série de molécules actives notamment la PGD₂, la PGE₂, la PGF_{2 α} , la PGI₂ ainsi que le thromboxane A₂. C'est la PGD₂ qui va subir une série de réactions non-enzymatiques (perte de deux groupes hydroxyles et migration de la double liaison en position 13-14) donnant naissance à la 15d-PGJ₂ (Kikawa et al. 1984). Ces réactions de déshydratation se font en présence d'albumine mais sont beaucoup plus lentes que les réactions de formation des différentes PGs à partir de la PGH₂. La production de PGD₂ se fait par l'action de la PGD₂ synthase ou PGDS, qui est

retrouvée sous deux formes distinctes. La forme hématopoïétique (H-PGDS) est une protéine cytosolique et très abondante dans les mastocytes (Kanaoka et al. 2000) alors que la forme lipocaline (Lipocaline-type ou L-PGDS) est une protéine sécrétée et très abondante dans le cerveau (Urade and Hayaishi 2000).

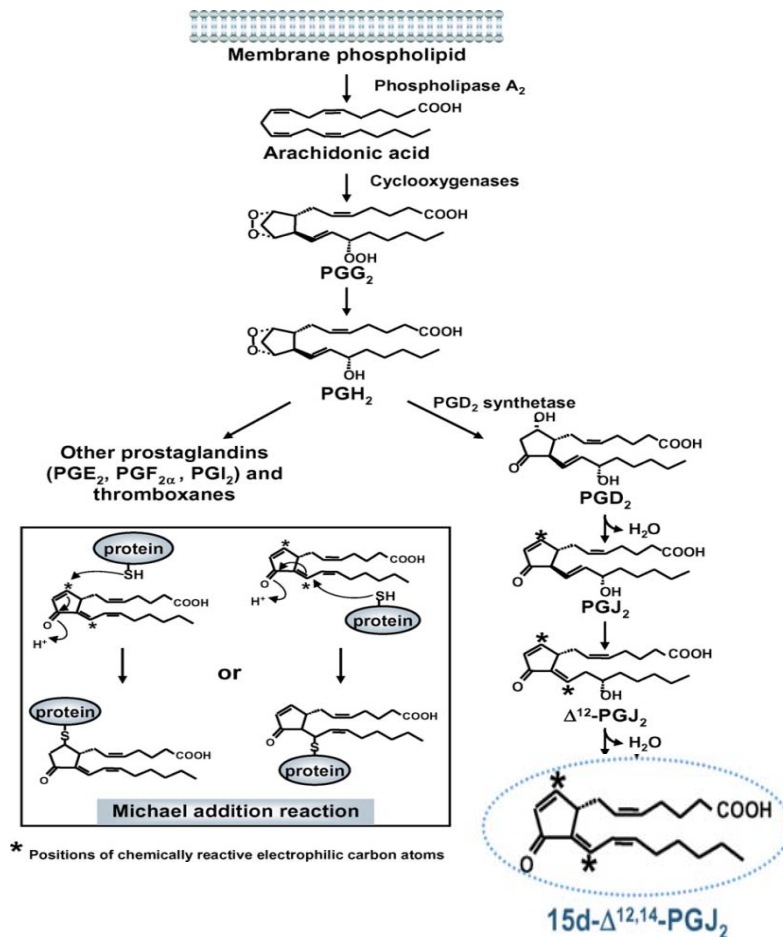


Figure 19 : Voie de synthèse de la 15d-PGJ₂

Dans une première étape, l'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A₂. L'acide arachidonique est ensuite converti en prostaglandine G₂ (PGG₂) puis en PGH₂, une réaction catalysée par les cyclooxygénases COX-1 et COX-2. La PGD₂ synthase va permettre la formation de la PGD₂, précurseur de la 15d-PGJ₂. LA PGD₂ subit alors deux déhydratations chimiques avec perte de deux groupes hydroxyles, associée à la migration de la double liaison en position 13-14 et donner naissance à la 15d-PGJ₂. D'après Kim et Surh 2006.

3.3.4.2 Cibles et fonctions biologiques de la 15d-PGJ₂

Vu son instabilité, la 15d-PGJ₂, comme les autres PGs, agit à proximité de son site de production, de façon autocrine et/ou paracrine. Contrairement aux autres PGs, aucun récepteur spécifique de la 15d-PGJ₂ n'a été identifié. Certaines études ont montré que comme la PGD₂, principal ligand de ce récepteur, la 15d-PGJ₂ pouvait se lier au récepteur DP2 des éosinophiles, et induire une augmentation du taux de calcium intracellulaire (Monneret et al. 2002; Monneret et al. 2003). Néanmoins, l'activité de la 15d-PGJ₂ est principalement liée aux liaisons covalentes formées avec des cibles intracellulaires. Son mécanisme d'entrée dans la cellule n'est pas bien connu mais il est possible qu'intervienne un mécanisme de transport actif similaire à celui décrit pour la PGA₂ et la Δ^{12} PGJ₂ (Narumiya and Fukushima 1986; Scher and Pillinger 2005).

La 15d-PGJ₂ peut réagir avec une large gamme de protéines, notamment des facteurs de transcription (Straus and Glass 2001). Parmi les différentes cibles de la 15d-PGJ₂, on distingue principalement les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) impliqués dans différentes fonctions, comme le contrôle de l'homéostasie des lipides et la différenciation des adipocytes (Alarcon de la Lastra et al. 2004). L'isoforme γ (PPAR γ) en particulier joue un rôle important dans l'inflammation, la réponse immunitaire et dans la pathogénie de certaines maladies comme l'athérosclérose, le diabète, l'obésité, et la maladie d'Alzheimer (Alarcon de la Lastra et al. 2004). La 15d-PGJ₂ a été démontrée comme étant un ligand naturel de PPAR γ en 1995 (Forman et al. 1995; Kliewer et al. 1995). Une grande partie des fonctions de 15d-PGJ₂ serait médiée par l'activation de PPAR γ (Cuzzocrea et al. 2003; Munoz et al. 2005; Yuan et al. 2005; Kim and Surh 2006). Le mécanisme d'activation de PPAR γ par la 15d-PGJ₂ est illustré dans la figure 20.

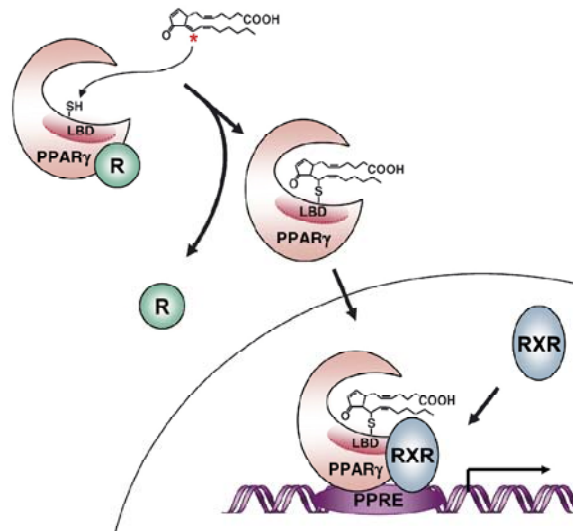


Figure 20 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation de PPAR γ par la 15d-PGJ $_2$

La 15d-PGJ $_2$ se lie au récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor) provoquant sa séparation de son corépresseur (R). On suppose que le carbone en position 14 (*) de la 15d-PGJ $_2$ interagit avec la cystéine Cys285 présente dans le domaine de liaison au ligand LBD (ligand binding domain) de PPAR γ . Une fois transféré dans le noyau, le complexe 15d-PGJ $_2$ -PPAR γ forme un hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR (Retinoid X receptor) qui va reconnaître la région PPRE (PPAR γ response element) au niveau du promoteur des gènes cibles afin de stimuler leur expression. D'après Kim et Surh 2006.

La 15d-PGJ $_2$ peut aussi interagir avec d'autres protéines et moduler différentes voies de signalisation comme la voie NF κ B, la voie AP-1 et la voie Nrf2 (décrite précédemment). Les mécanismes d'activation ou d'inhibition de ces trois voies par la 15d-PGJ $_2$ sont illustrés dans la figure 21.

La 15d-PGJ $_2$ peut jouer des rôles variables en fonction des voies de signalisation ciblées. Elle peut avoir d'une part des effets anti-inflammatoires en inhibant les facteurs de transcription NF κ B ou AP-1 associés à des gènes pro-inflammatoires. Ce rôle anti-inflammatoire explique l'implication de la 15d-PGJ $_2$ dans différentes situations pathologiques associées à une inflammation comme l'ischémie (Cuzzocrea et al. 2003; Lin et al. 2006), les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) (Wada et al. 2001) et la maladie d'Alzheimer (Combs et al. 2000). D'autre part la 15d-PGJ $_2$ peut induire l'expression de gènes antioxydants, notamment les gènes codant pour l'hème oxygénase-1 (HO-1), la γ -

glutamyl cystéine ligase (γ -GCL), la peroxyrédoxine I et la protéine Heat shock protein-70 (HSP-70) en activant la voie Nrf₂ (Itoh et al. 2004; Zhang et al. 2004; Chen et al. 2006). La 15d-PGJ₂ joue un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant induit par l'H₂O₂ (Aoun et al. 2003), du stress nitrosylant (Lim et al. 2004) et de l'excitotoxicité (Aoun et al. 2003).

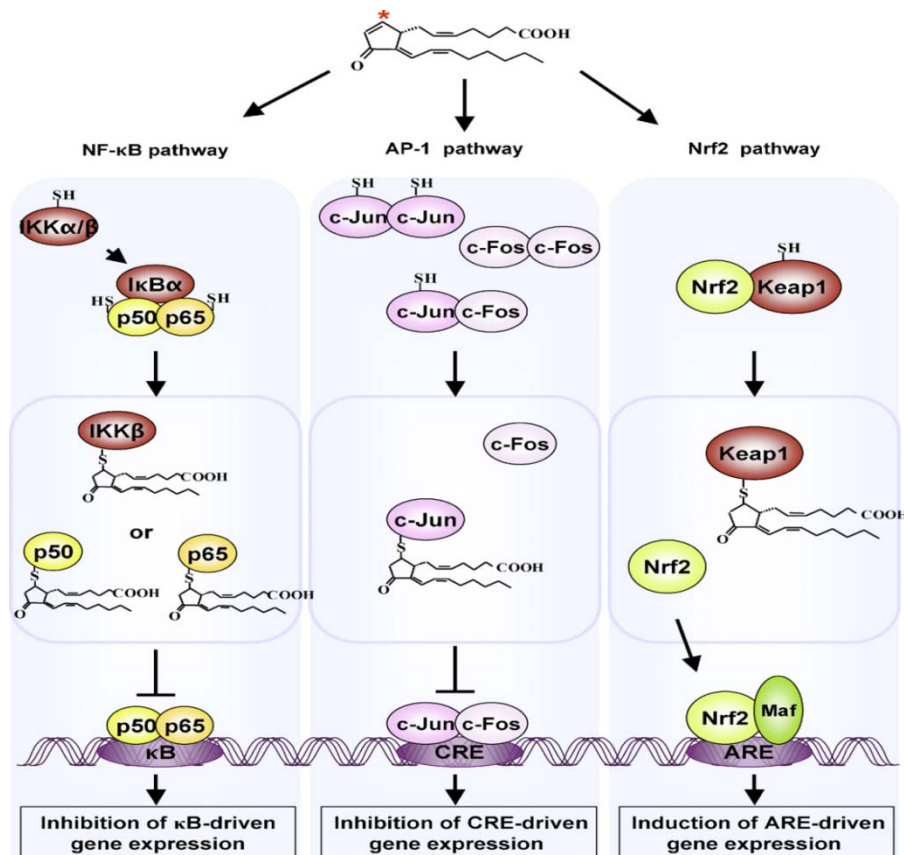


Figure 21 : Mécanismes de modulation des voies NF κ B, AP-1 et Nrf2 par la 15d-PGJ₂

La 15d-PGJ₂ interagit avec les résidus cystéine des protéines IKK β , I κ B α , p50 ou p65, conduisant à l'inactivation de NF- κ B.

La 15d-PGJ₂ interagit avec un résidu cystéine de la protéine c-Jun conduisant à l'inactivation d'AP-1.

La 15d-PGJ₂ peut activer la voie Nrf2 en se liant à un résidu cystéine de la protéine Keap1, répresseur de Nrf2. La liaison de Keap1 à la 15d-PGJ₂ provoque sa séparation de Nrf2 et la translocation de ce dernier au noyau. Il en résulte une induction des gènes antioxydants.

La modification des différentes protéines est due au carbone électrophile présent au niveau du groupement carbonyle insaturé α,β (*). D'après Kim et Surh 2006.

Mais à l'inverse, la 15d-PGJ₂ peut générer des ERO qui vont modifier le potentiel rédox de la cellule et créer une situation pro-oxydante. Cela explique les effets cytotoxiques de la 15d-PGJ₂ à fortes concentrations observés dans certaines études (Kondo et al. 2001; Koh et al. 2005). La 15d-PGJ₂ peut établir des liaisons covalentes avec des protéines cellulaires mais également oxyder leurs résidus cystéine, modifiant ainsi leurs propriétés physiologiques. Ainsi, il existe une dualité du rôle de la 15d-PGJ₂ qui peut avoir des effets protecteurs à de faibles concentrations (jusqu'à 8 µM) et un effet toxique au-delà (Koh et al. 2005).

Objectifs de l'étude

L'analyse des données de la littérature a permis de mettre en évidence l'implication du stress oxydant dans les pathologies digestives, notamment celles touchant le système nerveux entérique (SNE). En effet, une dégénérescence des neurones entériques semble associée d'une façon directe ou indirecte à l'initiation et la progression d'un grand nombre de pathologies digestives. Les cellules gliales entériques (CGE), composant majeur du SNE, sont très similaires aux astrocytes du SNC dont le rôle neuroprotecteur est établi dans différentes situations de stress. Ce travail de thèse a pour but d'étudier le rôle des CGE dans le contrôle de la survie des neurones entériques par analogie aux données obtenues au niveau du SNC.

Les trois objectifs majeurs de cette étude sont:

- mettre en évidence le rôle neuroprotecteur des CGE ;
- déterminer les différents mécanismes impliqués dans cette neuroprotection et identifier les facteurs gliaux responsables de ces effets neuroprotecteurs ;
- étudier l'implication des autres populations cellulaires présentes dans l'environnement des neurones, notamment les cellules épithéliales intestinales.

Ce travail de thèse sera présenté sous la forme de trois articles. Le premier est actuellement en révision, le second en préparation et le troisième publié. Dans le premier article, nous avons mis en évidence le rôle neuroprotecteur des CGE en conditions de base et en situation de stress oxydant. Nous avons également montré que cet effet neuroprotecteur des CGE était dû à la libération de facteurs solubles et que l'un de ces facteurs est le glutathion réduit qui a une action dans le microenvironnement neuronal. Enfin le rôle protecteur du glutathion a pu être

confirmé sur les neurones myentériques dans des cultures *ex vivo* de côlon de rat adulte.

Dans le deuxième article, nous objectivons un autre mécanisme de neuroprotection à long terme par les CGE. Ce mécanisme permettrait d'augmenter les capacités de défense des neurones via la libération de la prostaglandine 15d-PGJ₂.

Enfin dans le troisième article, nous avons montré que la neuroprotection au sein du SNE met en jeu différents types cellulaires présents à proximité du neurone, en particulier les cellules épithéliales intestinales.

Ces articles, présentés successivement, seront précédés par un résumé en français. Une discussion générale permettra de commenter l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

Résultats

Article 1 : Les cellules gliales entériques jouent un rôle neuroprotecteur lors d'un stress oxydant médié en partie par le glutathion réduit

Les deux populations cellulaires qui composent le système nerveux entérique (SNE) sont les neurones entériques et les cellules gliales entériques (CGE). Les CGE, plus nombreuses que les neurones (Hoff et al. 2008), restent méconnues. Il a été montré dans différentes études que les CGE jouent un rôle important dans le contrôle des fonctions du SNE. En effet, les CGE expriment les enzymes responsables de la synthèse d'acides aminés nécessaires pour la production de neuromédiateurs par les neurones (Nagahama et al. 2001). Les CGE sont également capables de moduler le phénotype neurochimique du SNE (Aube et al. 2006). Des travaux préliminaires suggèrent également que les CGE sont impliquées dans le contrôle de la survie neuronale. Des altérations du réseau glial ont par exemple été observées dans des pathologies caractérisées par une dégénérescence du SNE comme la maladie de Chagas (da Silveira et al. 2009) ou la diverticulose colique (Bassotti et al. 2005). Ce rôle a également été illustré dans un modèle de souris transgéniques dépourvues de CGE. Les auteurs ont observé chez ces souris une dégénérescence des neurones entériques qui se caractérise par une diminution du nombre et de la taille des neurones (Bush et al. 1998). Toutefois, la présence d'une inflammation aigüe chez ces souris ne permet pas de déterminer si la dégénérescence neuronale observée n'est pas une conséquence directe de l'état inflammatoire.

Le rôle direct des CGE dans le contrôle de la survie neuronale reste donc à caractériser. Le but de cette première étude a donc été de mettre en évidence ce rôle neuroprotecteur et de déterminer en partie les mécanismes impliqués.

Le rôle neuroprotecteur des CGE a été étudié dans un modèle de stress oxydant. Deux agents pro-oxydants ont été utilisés, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la dopamine. L' H_2O_2 est une molécule pro-oxydante générale qui provoque une mort neuronale rapide et brutale dès 2 heures de traitement, devenant maximale à 10 heures. La dopamine, au contraire, a un effet neurotoxique plus progressif. La mort neuronale provoquée par la dopamine apparaît dès 8 heures et augmente progressivement jusqu'à 24 heures. L'action plus lente de la dopamine est due à son auto-oxydation progressive dans le milieu de culture, qui donne naissance aux produits toxiques que sont l' H_2O_2 et les dopamine-quinones.

Le modèle cellulaire principal utilisé dans cette étude est une culture primaire de SNE préparée à partir d'intestins d'embryons de rats récupérés au stade E14.5 de gestation (Chevalier et al. 2008). Ces cultures primaires sont maintenues pendant 13 jours, ce qui permet la mise en place d'un réseau neuronal *in vitro* composé de ganglions reliés par des fibres interganglionnaires. Ces cultures primaires constituent un modèle pluricellulaire constitué par des neurones, des cellules gliales et des cellules musculaires lisses.

Afin d'étudier les interactions neuro-gliales et plus particulièrement les effets neuroprotecteurs des CGE, la première démarche a consisté à détruire spécifiquement les CGE dans notre système pluricellulaire et de voir l'impact de cette destruction sur la survie neuronale en conditions de base et suite à un traitement pro-oxydant. Les cultures primaires ont donc été infectées avec des particules adénovirales exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV-TK) sous contrôle d'un promoteur CMV (cytomégalovirus). Nous avons montré dans une première étape qu'un ciblage spécifique des cellules gliales pouvait être obtenu en infectant les cultures avec des adénovirus contenant deux constructions différentes, la première permettant d'exprimer la protéine GFP (green fluorescent protein) sous

contrôle du promoteur CMV et la deuxième exprimant le gène codant pour la β -galactosidase associé à un signal de localisation nucléaire NLS (nuclear localisation signal). La transduction des cultures primaires a permis de confirmer une infection spécifique des cellules gliales. L'analyse des cultures infectées par immunocytochimie montre que 80% environ des cellules infectées correspondent à des cellules gliales (immunoréactives pour la GFAP ou pour SOX10) et qu'aucune cellule infectée n'est immunoréactive pour le marqueur neuronal Hu. En se basant sur ces résultats, les cultures primaires de SNE ont été alors infectées par des adénovirus exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès. Les cultures ont été alors traitées au ganciclovir (GCV) pendant 6 jours afin de détruire spécifiquement les cellules transduites, le GCV étant transformé par la thymidine kinase virale en analogues toxiques des bases puriques. L'analyse des cultures par immunofluorescence montre une altération du marquage GFAP et une réduction de 48% environ du nombre de cellules SOX-10-immunoréactives (marqueur nucléaire spécifique des CGE).

Afin d'évaluer la mort neuronale dans ces cultures déplétées en CGE, nous avons mesuré la libération de la NSE (neuronal specific enolase), protéine neuronale cytoplasmique libérée dans le milieu de culture par les cellules perméables. La quantité de NSE libérée est significativement plus élevée dans les cultures primaires infectées après traitement au GCV comparée aux cultures non traitées par le GCV. De plus, l'induction d'un stress oxydant dans ces cultures provoque une augmentation significative de la NSE libérée obtenue dans les cultures infectées en conditions de base. Ces résultats confirment le rôle crucial que jouent les CGE en terme de neuroprotection tant en conditions basales qu'en présence d'un stress oxydant.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons voulu étudier les mécanismes impliqués dans l'effet neuroprotecteur des CGE. Pour cela, nous avons utilisé un modèle simplifié en co-cultivant des lignées de CGE avec une lignée de neuroblastome SH-SY5Y. La co-culture directe ou indirecte des CGE avec les cellules SH-SY5Y confirme les effets neuroprotecteurs obtenus avec les cultures primaires

de SNE. De plus le milieu conditionné de CGE permet suite à des ajouts répétés de réduire la mort induite par le stress oxydant. Les effets neuroprotecteurs des CGE seraient donc dus à la production d'un ou plusieurs facteurs solubles.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons montré que l'un des facteurs responsables des effets neuroprotecteurs est le glutathion réduit. Après avoir démontré que le glutathion sous sa forme réduite, a des effets protecteurs, nous avons utilisé des approches génétique (ARN interférence) et pharmacologique (L-buthionine sulfoximide) pour bloquer la synthèse de glutathion en inhibant son enzyme clef, la glutamate-cystéine ligase (GCL). Ainsi, l'inhibition de synthèse de glutathion dans les lignées de CGE induit une réduction de leurs effets neuroprotecteurs. Ceci confirme que le glutathion réduit, produit et libéré par les CGE, est responsable en partie des effets neuroprotecteurs des CGE lors d'un stress oxydant.

Les effets du glutathion ont été notamment confirmés dans des cultures *ex vivo* de côlon de rat adulte. Nous avons ainsi montré que la culture des tissus pendant 24h en présence d' H_2O_2 1mM induisait une augmentation importante de l'expression de la caspase-3 active par les neurones myentériques. L'addition simultanée de glutathion réduit (5 mM) permet de réduire d'une manière significative la proportion des neurones immunoréactifs pour la caspase-3 active. Ceci confirme l'effet neuroprotecteur du glutathion réduit au sein d'un système plus intégratif de SNE.

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle neuroprotecteur des CGE en conditions de base et lors d'un stress oxydant. Les effets des CGE seraient médiés par la libération de facteurs solubles. Nous avons identifié le glutathion réduit comme étant l'un de ces facteurs, dont l'effet serait médié une action directe sur le microenvironnement neuronal.

Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part *via* reduced glutathione

Hind Abdo,^{*,†,‡} Pascal Derkinderen,^{*,†,‡,§} Priya Gomes,^{||} Julien Chevalier,^{*,†,‡}
Philippe Aubert,^{*,†,‡} Damien Masson,^{*,†,‡} Jean-Paul Galmiche,^{*,†,‡}
Pieter Vanden Berghe,^{||} Michel Neunlist,^{*,†,‡,§} and Bernard Lardeux^{*,†,‡,1}

^{*}INSERM, U913, Nantes, France; [†]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; [‡]Institut des Maladies de l'Appareil Digestif and [§]Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Nantes, France; and ^{||}Center for Gastroenterological Research, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium

ABSTRACT Enteric glial cells (EGCs) are essential in the control of gastrointestinal functions. Although lesions of EGCs are associated with neuronal degeneration in animal models, their direct neuroprotective role remains unknown. Therefore, the aims of this study were to demonstrate the direct neuroprotective effects of EGCs and to identify putative glial mediators involved. First, viral targeted ablation of EGCs in primary cultures of enteric nervous system increased neuronal death both under basal conditions and in the presence of oxidative stress (dopamine, hydrogen peroxide). Second, direct or indirect coculture experiments of EGC lines with primary cultures of enteric nervous system or neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y) prevented neurotoxic effects induced by oxidative stress (increased membrane permeability, release of neuronal specific enolase, caspase-3 immunoreactivity, changes in $[Ca^{2+}]_i$ response). Finally, combining pharmacological inhibition and mRNA silencing methods, we demonstrated that neuroprotective effects of EGCs were mediated in part by reduced glutathione but not by oxidized glutathione or by S-nitrosoglutathione. Our study identified the neuroprotective effects of EGCs *via* their release of reduced glutathione, extending their critical role in physiological contexts and in enteric neuropathies.—Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., Lardeux, B. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part *via* reduced glutathione. *FASEB J.* 24, 000–000 (2010). www.fasebj.org

Key Words: enteric nervous system • neuronal death • neuroprotection • active caspase 3

CONSIDERED THE LARGEST AND MOST complex component of the peripheral nervous system, the enteric nervous system (ENS) is an integrative network located within the gastrointestinal (GI) tract (1). It is composed of two main cell populations, enteric neurons and enteric glial cells (EGCs) (2). Although the role of enteric neurons in the regulation of GI functions has been thor-

oughly studied, the contribution of EGCs remains largely unknown. It is suggested that EGCs represent the ENS counterpart of astrocytes of the central nervous system (CNS), because they share morphological and immunohistochemical features of astrocytes (3–5).

The traditional assumption that EGCs are simple and static supportive elements has been challenged by several studies indicating that they may participate in the regulation of GI functions such as motility or barrier functions (6, 7). EGCs have been shown to inhibit the proliferation of intestinal epithelial cells (8) and to reduce intestinal epithelial paracellular permeability (9). *In vivo*, conditional ablation of EGCs increased both paracellular permeability and intestinal epithelial cell proliferation (8–10), as well as reduced gastric emptying and intestinal transit (11). Further reinforcing the role of EGCs in human diseases with motility or barrier dysfunction, recent studies have reported a decreased number of EGCs or EGC markers in patients with slow transit constipation, idiopathic megacolon, and colonic diverticular disease (12–14).

In contrast to CNS astrocytes, studies on the role of EGCs in the regulation of the enteric neuronal functions, and in particular their neuroprotective role, are still scarce. Using a transgenic model of moderate glia alterations, EGCs were shown to modify the neurochemical phenotype in the ENS without a change in the number of neurons (11). In contrast, following major ablation of EGCs, a significant decrease in the number of myenteric neurons was observed compared to control (10). Regarding this putative neuroprotective role of EGCs, glial-derived neurotrophic factor, a trophic factor known to be secreted by astrocytes, was shown to have neuroprotective effects in diabetic enteric neuropathy (15, 16). Nevertheless, it remains unknown whether this factor is produced and secreted by EGCs and, more important, whether EGCs have direct protective effects. The absence of conclusive data about the neuroprotective effects of EGCs is probably

¹ Correspondence: INSERM U913 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. E-mail: bernard.lardeux@univ-nantes.fr
doi: 10.1096/fj.09-139519

due in part to the fact that EGCs have a central role in controlling GI homeostasis. Because *in vivo* lesions of EGCs lead to major GI dysfunctions and fulminant death of the animals (10, 17), it is difficult to evaluate their direct neuroprotective role. Using primary cultures of ENS could help in deciphering the neuroprotective role of EGCs, because they reproduce major features of the ENS observed *in vivo*, and they allow the study of long-term effects of glia ablation on enteric neuronal survival. Furthermore, coculture of EGCs with neuronal cells could allow addressing the direct neuroprotective effects of EGCs.

Therefore, in this work, we first aimed to develop an experimental method to selectively target and invalidate EGCs in primary cultures of ENS. We then aimed to demonstrate the direct neuroprotective effects of EGCs and identify glial factors involved in EGC-mediated neuroprotection. Using a coculture model of EGCs and neurons, we further show that EGCs protect neuronal cells and enteric neurons from the toxicity induced by oxidative stress. Finally, we provide strong evidence that these effects are mediated by soluble factors and that reduced glutathione (GSH) is one of the factors involved.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture models

Primary culture of ENS

Intestines of embryonic day 15 rat embryos (35–45 embryos/isolation from 3 pregnant Sprague-Dawley rats; CERJ, Le Genest St. Isle, France) were removed and finely diced in Hank's buffered salt solution (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 50 U/ml penicillin and kept on ice. Intestines were triturated mechanically using a scalpel. Tissue fragments were collected with 5 ml of DMEM/F12 (1:1) medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 50 U/ml penicillin and digested at 37°C for 15 min in the presence of 0.1% (v/v) trypsin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The trypsin reaction was stopped by adding 10 ml of medium containing 10% (v/v) FBS and then treated by 0.01% (v/v) DNase I (Sigma) for 10 min at 37°C. After trituration, cells were centrifuged at 75 *g* for 10 min. Cells were counted and seeded in DMEM/F12 containing antibiotics and 10% (v/v) FBS at a density of 2.4×10^5 cells/cm² on 12- or 24-well plates previously coated for 6 h with a solution of 0.5% (v/v) gelatin (Sigma). After 24 h, the medium was replaced with the same medium without FBS but containing 1% of N-2 supplement (Invitrogen). Half of the medium was replaced every 2 d, and primary cultures were maintained for 13 d.

Infection of primary cultures with adenoviral vectors

Adenoviral vectors Purified recombinant adenoviruses (Ad5-CMV-TK) that express the thymidine kinase of the herpes simplex virus under the cytomegalovirus (CMV) promoter were purchased from Vector Development Laboratory (Baylor College of Medicine, Waco, TX, USA). Both adenoviral particles expressing *Escherichia coli* β -galactosidase with nuclear localization signal (Ad5-CMV-NLS-lacZ) and green fluorescent protein (Ad5-CMV-GFP) under the CMV promoter were a gift from Dr. Nicolas Ferry (INSERM U948, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France).

Adenoviral transduction procedure. At 5 d after seeding, culture medium of primary cultures of ENS was removed and replaced with fresh N-2 medium mixed with the same volume of conditioned medium (centrifuged at 150 *g* for 5 min). Purified viruses (10^7 particles) were then added to the final volume to obtain a multiplicity of infection (MOI) of 20. Medium containing virus was removed after 8 h of incubation and replaced with fresh N-2 medium. Cultures infected with either Ad5-CMV-GFP or Ad5-CMV-NLS-LacZ were fixed after 48–72 h for analysis of GFP or β -galactosidase expression. Cultures infected with Ad5-CMV-GFP or Ad5-CMV-TK were treated with 2 μM ganciclovir (GCV) after 24 h during 6 d. Half of the medium (containing GCV) was replaced every 2 d.

Enteric glial cells

Transformed EGCs (CRL2690) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA), and nontransformed EGCs (NT) were obtained from Dr. Anne Rühl and prepared as described previously (18). These 2 glial cell lines were cultured in DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (BioWest, Logan, UT, USA), 1% (v/v) glutamine (Invitrogen), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Invitrogen), and 50 U/ml penicillin (Invitrogen).

Glutamate cysteine ligase (GCL)-deficient EGC lines

NT cells were transfected with pSUPER-neo.gfp vector plasmids coding for the shRNA against glutamate cysteine ligase catalytic subunit (shGCLc) or for the shRNA against luciferase (shLuc), both kindly provided by Dr. Juan P. Bolaños, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain (19). Cell transfections were performed using Lipofectamine 2000[®] (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Medium was renewed after 24 h, and cells were treated with G418 (1 mg/ml; Invitrogen) until stable expression of transgene (GFP-positive cells).

Neuroblastoma cell line cultures

Neuroblastoma SH-SY5Y cells were purchased from ATCC and maintained in SH medium: DMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 15% (v/v) FBS, 1% (v/v) glutamine, 1% (v/v) nonessential amino acids (Invitrogen), 50 U/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin.

For some experiments, SH-SY5Y cells were stably transfected with pEGFP-C1 plasmid (SH-EGFP). To do this, SH-SY5Y cells were harvested with trypsin-EDTA (Invitrogen) and washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Following centrifugation, cells were suspended (2×10^6 cells/100 μl) in electroporation medium (PBS HEPES; Invitrogen) containing pEGFP-C1 plasmid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/10^6$ cells; Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France) and sonicated salmon sperm DNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/10^6$ cells; Invitrogen). This mixture was then transferred into an electroporation cuve (10 min at room temperature), and electroporation was realized using an electroporator (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) at 200 V and 950 μF for 25 ms. After 10 min incubation at room temperature, cells were resuspended in SH medium and seeded into flasks (Corning, Avon, France). Medium was changed after 5 h, and cells were treated with G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Invitrogen) after 48 h of culture until stable expression of enhanced GFP.

Coculture experiments

Direct coculture was obtained by seeding simultaneously SH-EGFP cells (0.65×10^5 cells/cm²) with EGCs (0.65×10^5

cells/cm²) or with SH-SY5Y cells (0.65×10^5 cells/cm², control condition) into 12-well plates. The coculture was then maintained in SH medium for 48 h prior to the experiments (Fig. 1A). For indirect coculture, EGCs were seeded onto porous filters (12-well Transwell Clear, 0.40 μ m porosity; Corning) at a density of 3.5×10^5 cells/cm². After 24 h, EGC filters were placed in the presence of SH-SY5Y cells (1.3×10^5 cells/cm²) or primary cultures of ENS seeded into the bottom of 12-well plates and cultured for 24 h before an additional 24 h treatment (Fig. 1B, C).

In addition, for some experiments, EGC-conditioned medium (EGC-CM) was collected from EGCs cultured for 24 h, and EGC-CM was centrifuged at 150 *g* for 5 min.

For intracellular calcium imaging, SH-SY5Y cells (1.2×10^5 cells/cm²) and EGCs (0.95×10^5 cells/cm²) were seeded either alone or in coculture onto 2 chambered glass slides (0.6×10^5 cells/cm² for each cell type; Nunc, Roskild, Denmark).

Organotypic culture

Specimens of distal colon of Sprague-Dawley adult rats were removed, opened along the mesenteric border, and rinsed free of luminal contents using sterile Krebs solution (117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂ and 11 mM glucose). Four segments (2 × 2 cm) were pinned flat out in a Sylgard-covered Petri dish, and the mucosa was stripped. Segments of colon were then pinned in sterile Sylgard-covered Petri dishes and maintained in organ culture with DMEM/F12 (1:1) supplemented

with 50 μ g/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. The segments were treated or not with 1 mM H₂O₂ in the presence or in the absence of 5 mM GSH over 24 h. After fixation in 4% paraformaldehyde at room temperature for 3 h followed by 3 washes with PBS, the submucosal layer and the circular muscle fibers were carefully removed, and longitudinal muscle/myenteric plexus preparations were processed for immunohistochemical studies.

Oxidative stress

Oxidative stress was induced using hydrogen peroxide (H₂O₂) and dopamine as prooxidant agents. Preliminary experiments were performed in order to determine the neurotoxic concentration of dopamine or H₂O₂. Over 24 h, dopamine and H₂O₂ induced a dose-dependent neurotoxic effect in SH-SY5Y cells, reaching a maximum at 1.2 mM and 200 μ M, respectively (data not shown). In addition, we showed that dopamine induced cell death of similar amplitude but more progressive as compared to H₂O₂ (Supplemental Fig. 1).

Assessment of cell viability

Immunohistochemical analysis

SH-SY5Y cells or primary cultures of ENS were fixed in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature for 1 h. Cells were then washed in PBS and permeabilized for

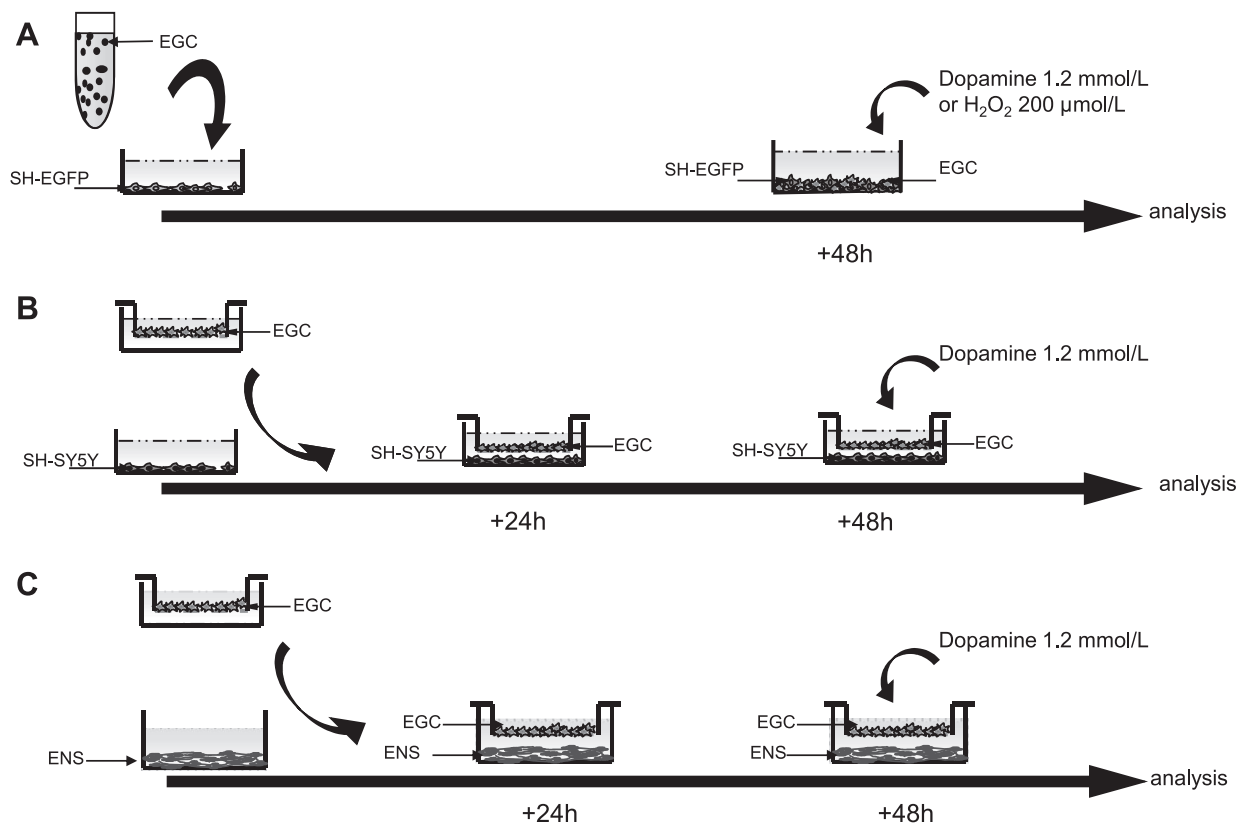


Figure 1. Schematic representation of the coculture models used to characterize the neuroprotective effects of EGCs against oxidative stress-induced neurotoxicity. *A*) Direct coculture of EGCs along with a neuroblastoma cell line stably transfected with pEGFP-C1 (SH-EGFP). Treatment with dopamine or hydrogen peroxide (H₂O₂) was performed after 48 h of coculture. *B*) Indirect coculture of SH-SY5Y cells with EGCs on transwell filters. Treatment with dopamine was performed after 24 h of coculture. *C*) Indirect coculture of primary cultures of ENS along with EGCs on transwell filters. Treatment with dopamine was performed after 24 h of coculture.

30 min in PBS/NaN3 containing 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) and 4% (v/v) horse serum before being incubated with mouse β -tubulin III (1:1000; Sigma), mouse Hu C/D (1:200; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), mouse Sox10 (1:200; gift of M. Wegner, University of Erlangen, Erlangen, Germany), rabbit anti-neuron-specific enolase (NSE, 1:2000; Biovalley, Marne La Vallée, France), rabbit glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:500; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), rabbit β -galactosidase (1:500; Chemicon International, Temecula, CA, USA), or rabbit active caspase 3 (1:2000; Sigma) antibodies for 90 min (cell cultures) or 24 h (whole-mount preparations). After incubation with primary antisera, cells were washed 3 times with PBS and incubated for 30 min (cell cultures) or 3 h (whole mount preparations) with the following secondary antibodies coupled to fluorophores: donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to carboxymethylindocyanine (1:500; Jackson Laboratories; Immunotech, Marseille, France), anti-mouse IgG conjugated to FluoProbes 488 (1:200; Interchim, Montluçon, France), or goat anti-rabbit IgG conjugated phycoerythrin (1:500; Imgenex, San Diego, CA, USA). Immunostained cultures were analyzed under a fluorescence microscope (Olympus IX 50; Olympus, Hamburg, Germany) fitted with adequate filter cubes. Pictures were acquired with a black-and-white video camera (4910; Cohu, Poway, CA, USA) connected to a Macintosh computer (Apple Computer, Cupertino, CA, USA) via a frame-grabber card (Scion Image; Scion, Frederick, MD, USA).

To analyze the proportion of caspase 3 activation, the number of active caspase 3-immunoreactive (IR) cells and Hu-IR cells was counted in ≥ 20 ganglia/well in primary cultures (448 ± 9 neurons/condition) and 10 ganglia (242 ± 4 neurons/condition) in whole-mount preparations and per condition. To standardize the changes in the proportion of active caspase-3 IR cells, data were expressed in terms of percentage of active caspase 3-positive neurons on total neuronal population as assessed by Hu immunostaining.

Analysis by flow cytometry

At the end of the experiment, SH-SY5Y or SH-EGFP cells were collected both in the supernatant and on the bottom of the wells following treatment with trypsin-EDTA. Cell suspension was then centrifuged for 5 min at 550 *g* and resuspended in 500 μ l of 0.1 M PBS.

Membrane permeability was evaluated by flow cytometry using 7-amino-actinomycin D (7-AAD) or propidium iodide (PI) as DNA fluorescent markers. Two hundred microliters of cell suspension was incubated with 7-AAD or PI for 10 min before acquisition using BD FACSSarray (Le Pont de Claix, France) for SH-SY5Y or BD FACSCalibur for SH-EGFP. The degree of neuronal injury was then quantified by analyzing the cell permeability to PI, and the number of SH-EGFP cells was analyzed for GFP fluorescence. Results were expressed as percentage of total cells.

To analyze the proportion of caspase-3 activation in SH-SY5Y cells, the immunostaining procedure was performed on cells resuspended in PBS after fixation (1 h in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature), as described previously, and cells were centrifuged after each step (1 min, 550 *g*). Analysis of phycoerythrin-positive cells was performed using BD FACSSarray. Results were expressed as percentage of total cells.

Detection of NSE

NSE released in the culture medium was quantified by immunoradiometric assay (Prolifigen[®] NSE IRMA; Diasorin, Stillwater, OK, USA) according to the manufacturer's protocol. Results are expressed in nanograms per milliliter. Experiments have been per-

formed to validate the measure of the release of NSE in the culture medium as a marker of neuronal cell death (Supplemental Fig. 2).

Intracellular calcium

Experiments were performed in a modified HEPES buffered Krebs solution containing 148 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, and 10 mM HEPES, at pH 7.38 (Merck, Brussels, Belgium). In the high- K^+ medium, the K^+ concentration was elevated to 75 mM, and Na^+ was reduced to 78 mM.

Resting intracellular calcium concentrations $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and K^+ -induced transient changes were assayed by fluo-4 imaging. Cells were rinsed with HEPES buffer and then loaded with the Ca^{2+} -sensitive dye Fluo-4 AM (10 μ M; Molecular Probes) for 2 h at room temperature. The dye was excited at 488 nm, and its fluorescence emission was collected at 525/50 nm. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following high K^+ stimulation were measured with a confocal microscope (Nikon TE300; Noran Instruments, Middleton, WI, USA) using a 20 \times objective. Further analysis was done using custom-written macros in IGOR PRO (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Regions of interest were drawn over each cell, and average fluorescence intensity was calculated and normalized to its starting level. Changes in normalized fluorescence are directly proportional to changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Glutathione assay

Total glutathione, comprising both reduced and oxidized forms, was measured in a microtiter plate assay using a glutathione assay kit (Sigma). The content of glutathione was normalized to the protein content quantified by the Bio-Rad protein assay.

Reagents

Dopamine hydrochloride, hydrogen peroxide, L-buthionine sulfoximine (BSO), GSH, S-nitrosoglutathione (GSNO), and oxidized glutathione (GSSG) were all purchased from Sigma. PI and 7-AAD were purchased from BD Bioscience (San Jose, CA, USA).

Statistics

Data are expressed as means \pm SE, and results were analyzed by 1-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test or by a *t* test (as indicated in figure legends). SigmaStat software (Systat, San Jose, CA, USA) was used for statistical analysis.

RESULTS

Adenovirus-mediated targeting of EGCs in primary cultures of ENS

In the first part of the study, we determined whether adenoviral vectors could specifically infect EGCs. Primary cultures of ENS are organized in ganglia containing neurons and glial cells, as described previously (20). We infected primary cultures of ENS with adenoviral vectors expressing different transgenes controlled by the CMV promoter.

We first studied the expression of GFP controlled by the CMV promoter after infection by adenoviral particles (Ad5-CMV-GFP). Infection of primary cultures of ENS showed a high expression of GFP in $77 \pm 3\%$ ($n=3$) of EGCs identified with GFAP (Fig. 2A–C). In contrast, no Hu-IR neurons expressed GFP (Fig. 2D–F).

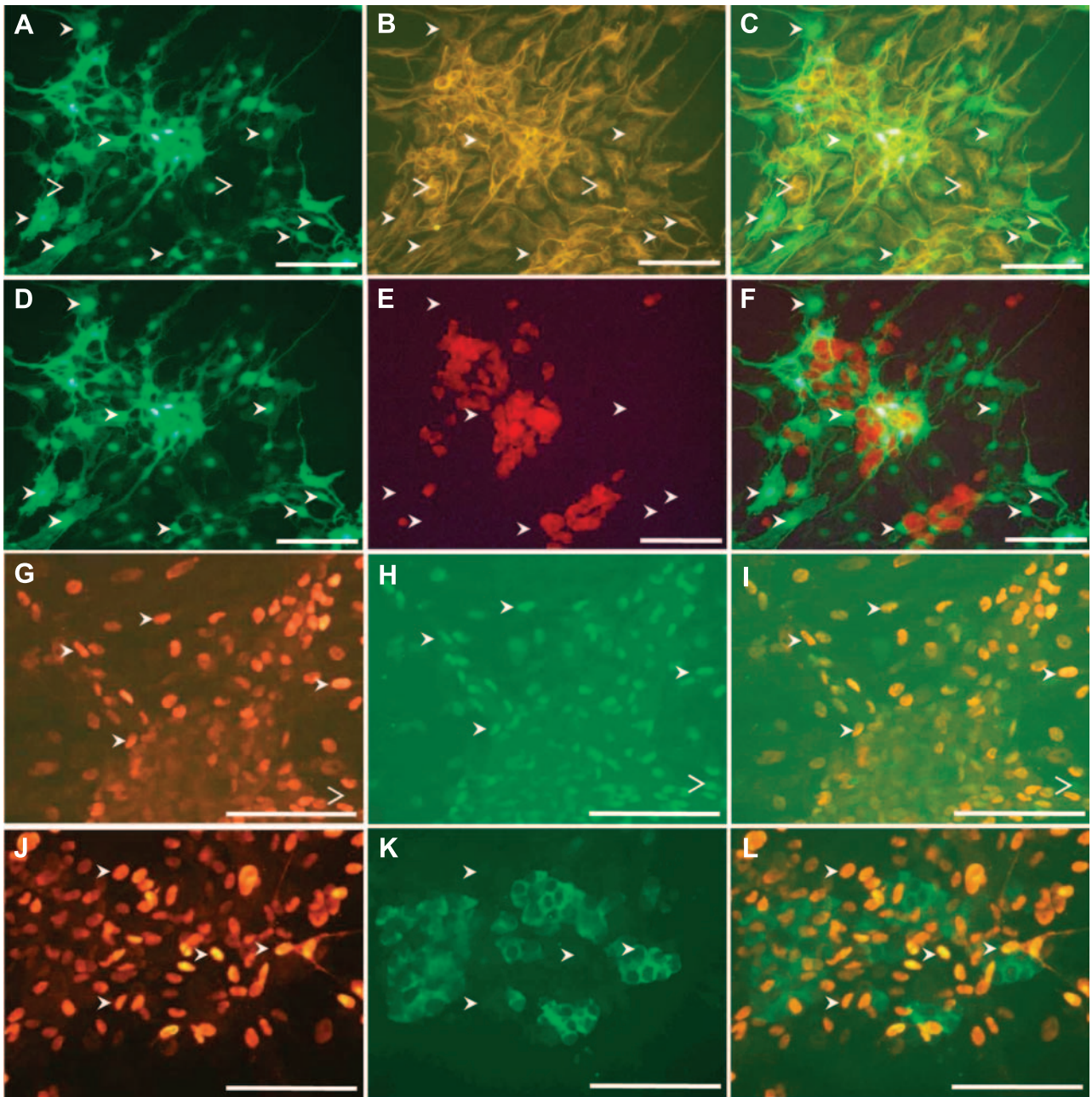


Figure 2. Adenovirus-mediated transduction of EGCs in primary culture of ENS. Primary cultures of ENS were transduced with Ad5-CMV GFP (A–F) or Ad5-CMV-NLS-lacZ (G–L) and analyzed with antibodies against GFAP (B), Hu (E, K), Sox10 (H), and β -galactosidase (G, J). Right panels show merged images (C, F, I, L). A large number of GFP-positive (A, solid arrowheads) or β -galactosidase-IR cells (G, solid arrowheads) coexpressed EGC markers such as GFAP (B) or Sox10 (H), respectively. Open arrowheads indicate examples of EGCs without expression of GFP or β -galactosidase. No colocalization between Hu-IR cells (E, K) and GFP-positive (D) or β -galactosidase-IR cells (J) was observed. Images are representative of 3 independent experiments. Scale bars = 100 μ m.

To confirm the ability to selectively express another protein by EGC, we infected primary cultures of ENS with adenoviral particles Ad5-CMV-NLS-LacZ. Under these conditions, $85 \pm 2\%$ ($n=3$) of EGCs (identified with the nuclear marker Sox10) expressed β -galactosidase (Fig. 2G–I). In contrast, no HU-IR neurons expressed β -galactosidase (Fig. 2J–L).

These results showed that EGCs can be selectively targeted in primary cultures of ENS by using an adeno-

viral vector expressing a transgene under the control of the CMV promoter.

Specific ablation of EGCs by adenovirus-mediated transduction of herpes simplex virus thymidine kinase affects neuronal survival in primary cultures of ENS

To achieve cellular ablation of EGCs, we used an adenovirus mediated transduction of the thymidine kinase gene

of the herpes simplex virus (HSV-TK) under the control of the CMV promoter. Further treatment with GCV would induce cell death of proliferating cells expressing the transgene-derived HSV-TK (21, 22).

Transduction of primary cultures of ENS with Ad5-CMV-TK followed by GCV treatment (2 μ M; 6 d) induced an important disorganization of the GFAP-IR glial network (Fig. 3C–D) compared to transduced cultures not treated with GCV (Fig. 3A, B). This disruption of the GFAP-IR glial network was associated with a significant decrease in the number of Sox10-IR cells ($48 \pm 5\%$, $n=3$, $P<0.05$). This disruption of glial network was associated with a significant increase of NSE release as compared to control (Fig. 3E) and a significant reduction in the number of Hu-IR neurons per ganglia as compared to control (22 ± 2 vs. 30 ± 2 ; $n=4$; $P<0.05$).

The role of EGCs in primary cultures of ENS was further assessed following oxidative stress induced by either dopamine or hydrogen peroxide. Dopamine treatment (1.2 mM; 24 h) induced a significant increase of NSE release as compared to control (Fig. 3F).

This dopamine-induced NSE release was significantly enhanced in transduced cultures with Ad5-CMV-TK after GCV treatment as compared to the transduced cultures in the absence of GCV (Fig. 3F). H_2O_2 treatment (200 μ M; 24 h) induced a significant increase of NSE release that was significantly increased in Ad5-CMV-TK transduced cultures after GCV treatment (Fig. 3G).

Neuroprotective effects of EGCs against oxidative stress are mediated by one or more soluble factors

To study the direct neuroprotective effects of EGCs, further experiments were performed using the neuroblastoma cell line SH-SY5Y in either direct or indirect coculture with EGCs (Fig. 1A, B). Dopamine treatment of SH-EGFP cells directly cocultured with SH-SY5Y cells increased significantly the proportion of PI-positive SH-EGFP as compared to untreated cells (Fig. 4A). In contrast, the effects of dopamine on cell permeability

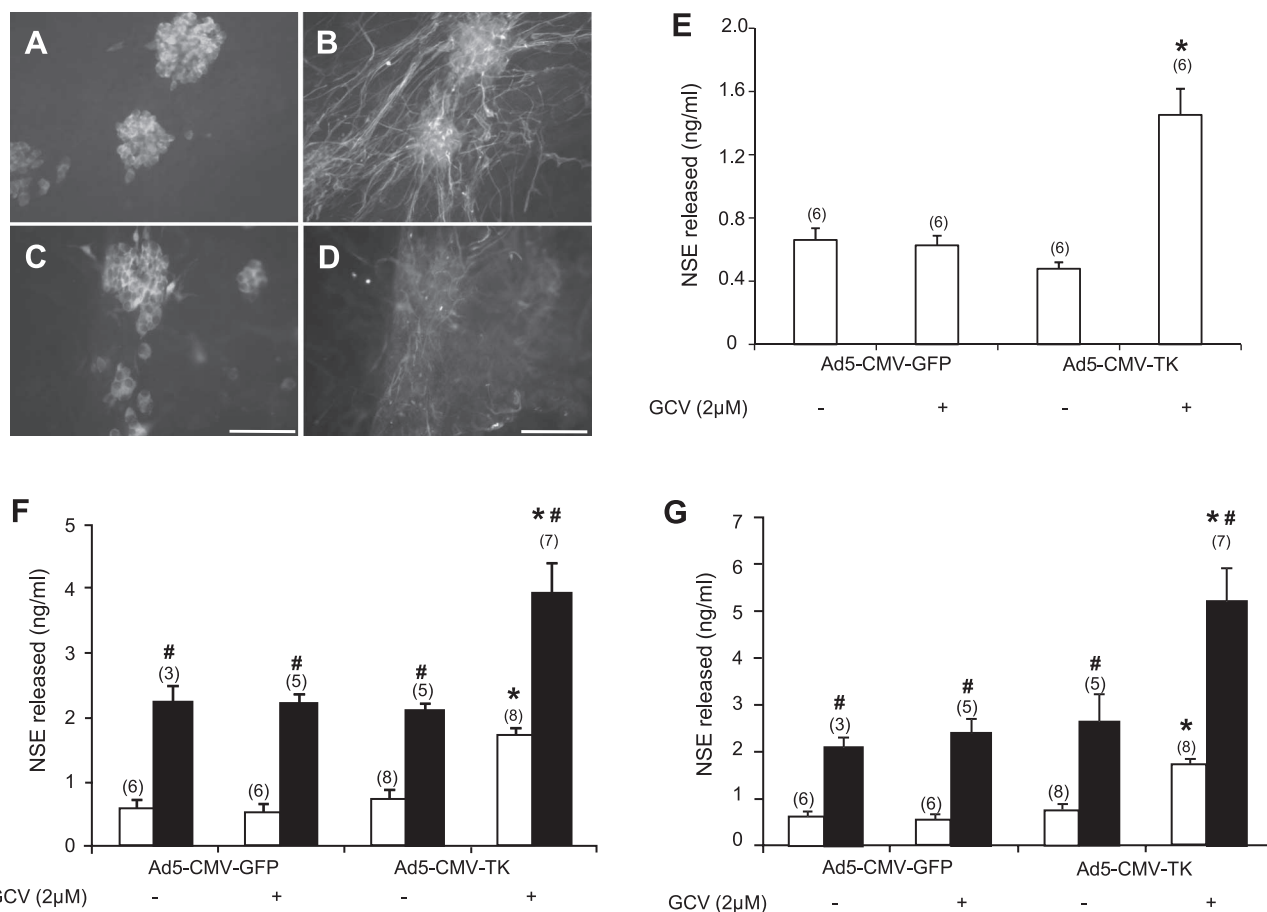


Figure 3. Genetically mediated ablation of EGCs induces neuronal cell death in primary cultures of ENS. A–D) Primary cultures of ENS were transduced with Ad5-CMV-TK or Ad5-CMV-GFP cultured for 6 d in the presence or absence of GCV (2 μ M). Immunostaining of primary cultures of ENS transduced with Ad5-CMV-TK with antibodies against Hu (A, C) and GFAP (B, D) revealed a significant loss of GFAP-IR structures (D) following treatment with GCV as compared to cultures not treated with GCV (B). Images are representative of 6 independent experiments. Scale bars = 100 μ m. E–G) Amount of neuron-specific enolase (NSE) released in medium of primary cultures of ENS (transduced with Ad5-CMV-GFP and Ad5-CMV-TK) in the absence of oxidative stress (E; open bars) or following treatment with dopamine (F; solid bars) or H_2O_2 (G; solid bars) for 24 h. Values are means \pm SE (n independent experiments). * $P < 0.05$ vs. all other respective conditions; # $P < 0.05$ vs. respective control; 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test.

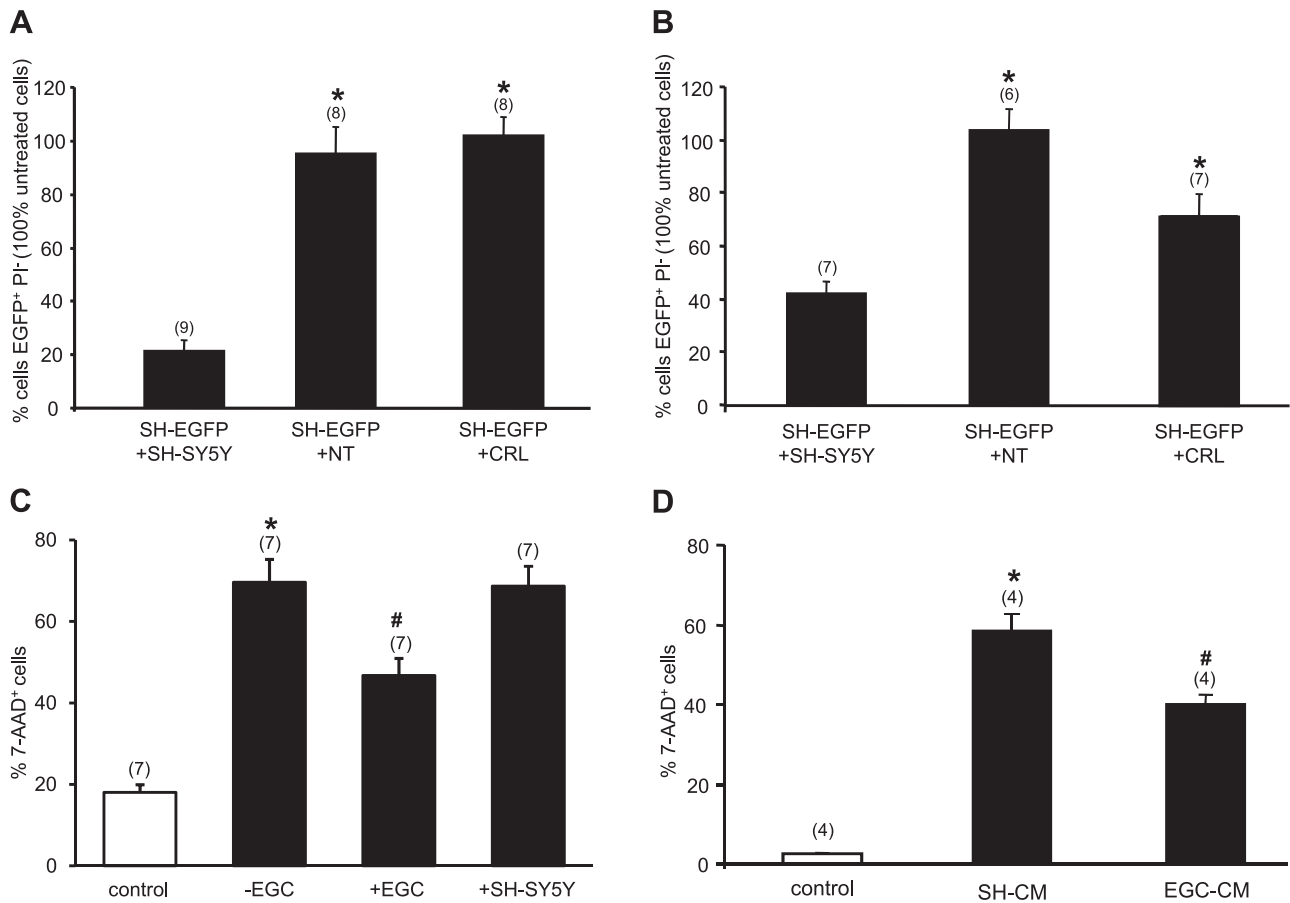


Figure 4. Neuroprotective effects of EGCs are mediated by one or more soluble factors. *A, B*) SH-EGFP cells were cocultured directly with SH-SY5Y cells (SH-EGFP+SH-SY5Y) or with EGCs (SH-SY5Y+NT or SH-SY5Y+CRL). Cocultures were treated with dopamine (*A*) or hydrogen peroxide (*B*) for 24 h. Neuronal cell viability was evaluated by measuring the percentage of PI-negative cells (EGFP⁺ PI⁻) compared to EGFP⁺ PI⁻ in the absence of oxidative stress. Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05 vs. SH-EGFP + SH-SY5Y; 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. *C*) SH-SY5Y cells were not treated (control; open bar) or treated with dopamine (solid bars) for 24 h in the absence or presence of EGCs (-EGC and +EGC, respectively) or with SH-SY5Y (+SH-SY5Y), seeded in transwell filters. Neuronal cell death was analyzed by measuring the cell permeability to 7-AAD by flow cytometry. *D*) SH-SY5Y cells were treated with dopamine (solid bars) for 24 h with repeated addition of SH-SY5Y-conditioned medium (SH-CM) or EGC-CM. In the absence of oxidative stress (open bar), SH-SY5Y cells were treated with repeated addition of SH culture medium. Neuronal cell death was analyzed as in panel *C*. Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05 vs. control; #*P* < 0.05 vs. other treatments; 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test (*C, D*).

were prevented when SH-EGFP cells were cocultured with EGCs, either NT or CRL2690 (Fig. 4A). Similarly, H₂O₂ treatment of SH-EGFP cells directly cocultured with SH-SY5Y cells also significantly increased the proportion of PI-positive SH-EGFP cells as compared to untreated cells (Fig. 4B). Coculture of SH-EGFP cells with EGCs, either NT or CRL2690, significantly reduced the neurotoxic effects of H₂O₂ (Fig. 4B).

We next sought to determine whether the neuroprotective effects of EGCs were mediated through soluble factors using a noncontact coculture system (Fig. 1B). Treatment of SH-SY5Y cells cultured alone with dopamine induced a significant increase in cell permeability to 7-AAD as compared to control (without dopamine) (Fig. 4C). This increase was significantly reduced when SH-SY5Y cells were cocultured with EGCs but not with SH-SY5Y (Fig. 4C).

To further assess the role of soluble factors in the neuroprotective effects of EGC, experiments were per-

formed by culturing SH-SY5Y cells with EGC-conditioned medium (CM). A single addition of EGC-CM had no neuroprotective effects (data not shown). However, repeated addition of EGC-CM every 2 h for 10 h (starting 4 h before dopamine treatment) significantly reduced the percentage of cell permeability induced by dopamine as compared to control condition (addition of SH-CM) (Fig. 4D).

EGCs are protective against oxidative stress in coculture with primary cultures of ENS

To confirm that EGCs can protect enteric neurons during oxidative stress, an indirect coculture model of primary cultures of ENS and EGCs was used (Fig. 1C). Treatment with dopamine induced a sharp disruption of β -tubulin III network (Fig. 5B) as compared to control (Fig. 5A). In coculture experiments, EGCs

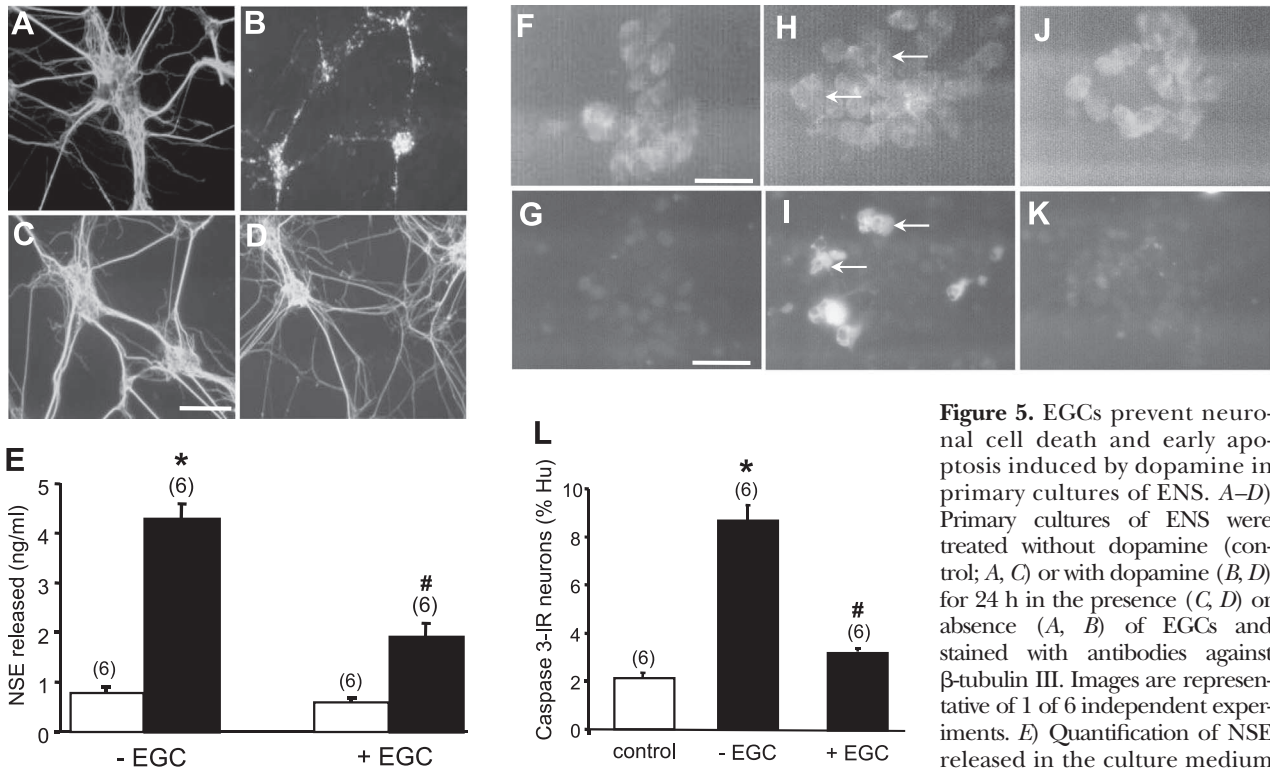


Figure 5. EGCs prevent neuronal cell death and early apoptosis induced by dopamine in primary cultures of ENS. *A–D*) Primary cultures of ENS were treated without dopamine (control; *A, C*) or with dopamine (*B, D*) for 24 h in the presence (*C, D*) or absence (*A, B*) of EGCs and stained with antibodies against β -tubulin III. Images are representative of 1 of 6 independent experiments. *E*) Quantification of NSE released in the culture medium of primary cultures of ENS not

treated (open bars) or treated with dopamine (solid bars) in the presence or absence of EGCs (+ EGC and –EGC, respectively). Values are means \pm SE (*n* independent experiments). *F–K*) Images of primary cultures of ENS treated without dopamine (control; *F, G*) or with dopamine (*H–K*) for 6 h in the absence (*H, I*) or presence (*J, K*) of EGCs seeded in transwell filters. Primary cultures were stained with antibodies against Hu (*F, H, J*) and active caspase-3 (*G, I, K*). Arrows indicate colocalization of active caspase-3 with Hu. *L*) Quantitative analysis of the proportion of active caspase-3 IR neurons (caspase 3-IR) vs. total neurons identified with Hu (20 ganglia/condition). Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05 vs. control; #*P* < 0.05 vs. other treatment; 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. Scale bars = 100 μ m (*C*); 50 μ m (*F, G*).

prevented dopamine-induced β -tubulin III alterations (Figs. 5*C, D*). In addition, the dopamine-induced increase in NSE release was significantly reduced in the presence of EGCs (Fig. 5*E*).

Early neuroprotective effects of EGCs are associated with an inhibition of apoptosis as well as with a preservation of the calcium signaling properties

We next sought to explore the early protective effects of EGCs on dopamine-induced neurotoxicity. No significant change in cell permeability and/or NSE release was observed before 6 h of dopamine treatment in SH-SY5Y or in primary cultures of ENS (data not shown). In primary cultures of ENS, dopamine (1.2 mM; 6 h) induced a significant increase in the proportion of active caspase-3-IR neurons as compared to control (Fig. 5*F–I, L*). In addition, the number of Hu-IR neurons per ganglia was not modified following 6 h treatment with dopamine as compared to control (19 ± 1 vs. 18 ± 1 , *n* = 6, *P* > 0.05). This increase in caspase-3-IR induced by dopamine was significantly reduced following coculture with EGCs (Fig. 5*J–L*).

Similarly, exposure of SH-SY5Y to dopamine (1.2 mM; 6 h) induced a significant increase in percentage

of active caspase-3-IR SH-SY5Y cells (Fig. 6*A, B, E*). This increase in caspase 3-IR was reduced by culturing SH-SY5Y cells in the presence of EGCs and EGC-CM medium (Fig. 6*C–E*). We next studied the effects of EGCs on the alterations induced by oxidative stress of intracellular Ca^{2+} response in SH-SY5Y. Dopamine significantly reduced the K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in SH-SY5Y cells. These alterations in SH-SY5Y cells were largely prevented following coculture with EGCs (Fig. 6*F*).

GSH is involved in the neuroprotective roles of EGCs

Finally, we aimed at identifying a glial mediator involved in these effects. A recent study has shown that EGCs secrete GSH (9), which has neuroprotective effects in the CNS (23).

We first showed in SH-SY5Y that GSH dose-dependently prevented the increase in cell permeability induced by dopamine, reaching a maximum effect at 1 mM (Fig. 7*A*). In contrast, both GSSG and GSNO, which are also produced by EGCs (9), had no protective effect (Fig. 7*B*). The neuroprotective effect of GSH was not observed when SH-SY5Y were pretreated for only 24 h with GSH (1 mM) prior to dopamine addition (Fig. 7*C*). Similarly, the pretreatment alone of primary cultures of ENS with GSH

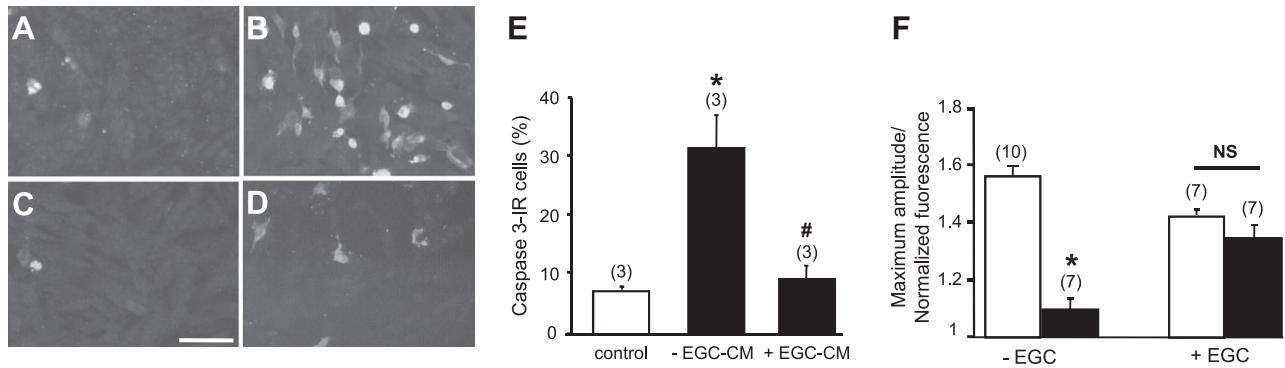


Figure 6. EGCs prevent early apoptosis and altered intracellular calcium response induced by dopamine in SH-SY5Y. *A–D*) Anti-active caspase-3 immunofluorescence staining of SH-SY5Y cells not treated (*A*) or treated with dopamine (*B–D*) in the absence (*B*) or presence (*C*) of EGCs or after repeated addition of EGC-conditioned medium (CM; *D*); representative images of 3 independent experiments. Scale bar = 100 μ m. *E*) Quantitative analysis by flow cytometry of the percentage of SH-SY5Y cells immunoreactive for active caspase-3 in the absence of oxidative stress (control; open bar) or following dopamine treatment and cultured in the absence of EGC-CM or in the presence of EGC-CM. Values are means \pm SE of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. other treatment; 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. *F*) Average amplitude of the intracellular Ca^{2+} rise induced by high K^+ application in SH-SY5Y cells grown in either the presence or absence of EGCs. $[Ca^{2+}]_i$ changes were assayed by Fluo-4 imaging after treatment of SH-SY5Y cells without (open bars) or with dopamine (solid bars) in the presence or absence of EGCs. Data are mean \pm SE of relative fluorescence (n independent experiments). * $P < 0.05$ vs. respective control; *t* test.

(24 h; 1 mM) was not sufficient to prevent the dopamine-induced release of NSE (Fig. 7D).

We next characterized the neuroprotective role of EGC-derived GSH by targeting EGC GCL, a key enzyme in the synthesis of GSH, using genetical and pharmacological approaches.

Transfection of EGCs with pSUPER-neo.gfp shRNA anti-GCL catalytic subunit (EGC shGCLc) induced a significant decrease in intracellular level of total glutathione (Fig. 8A) as compared to controls [EGCs transfected with pSUPER-neo.gfp shRNA anti-luciferase

(EGC shLuc)]. Coculture of EGC shGCLc with SH-SY5Y revealed a significant lower neuroprotective effect as compared to coculture with EGCs or EGC shLuc (Fig. 8B).

Treatment of EGCs with L-buthionine sulfoximine (BSO; 250 μ M; 16 h), a pharmacological inhibitor of GCL, significantly reduced the intracellular level of total glutathione (Fig. 8C) without affecting EGC viability (data not shown). Consequently, coculture of BSO-pretreated EGCs with SH-SY5Y significantly reduced the neuroprotective effects of EGCs (Fig. 8D).

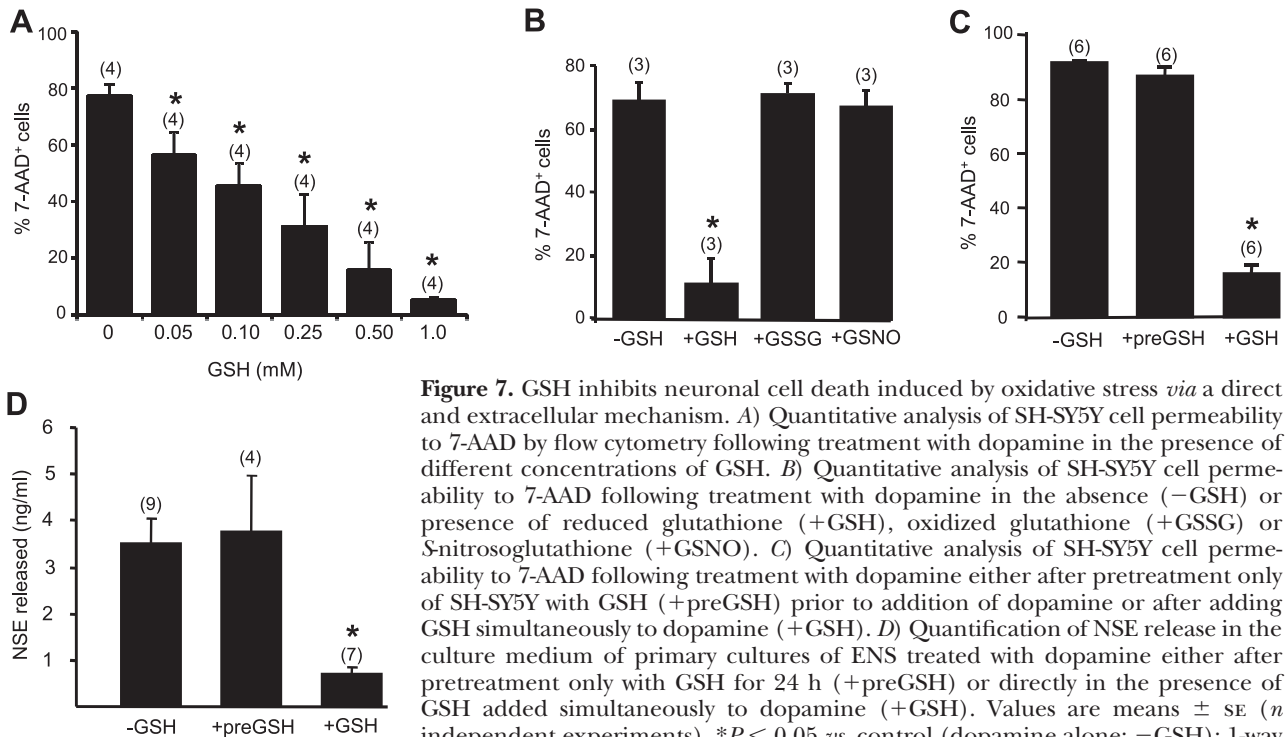


Figure 7. GSH inhibits neuronal cell death induced by oxidative stress *via* a direct and extracellular mechanism. *A*) Quantitative analysis of SH-SY5Y cell permeability to 7-AAD by flow cytometry following treatment with dopamine in the presence of different concentrations of GSH. *B*) Quantitative analysis of SH-SY5Y cell permeability to 7-AAD following treatment with dopamine in the absence (–GSH) or presence of reduced glutathione (+GSH), oxidized glutathione (+GSSG) or S-nitrosoglutathione (+GSNO). *C*) Quantitative analysis of SH-SY5Y cell permeability to 7-AAD following treatment with dopamine either after pretreatment only of SH-SY5Y with GSH (+preGSH) prior to addition of dopamine or after adding GSH simultaneously to dopamine (+GSH). *D*) Quantification of NSE release in the culture medium of primary cultures of ENS treated with dopamine either after pretreatment only with GSH for 24 h (+preGSH) or directly in the presence of GSH added simultaneously to dopamine (+GSH). Values are means \pm SE (n independent experiments). * $P < 0.05$ vs. control (dopamine alone; –GSH); 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test.

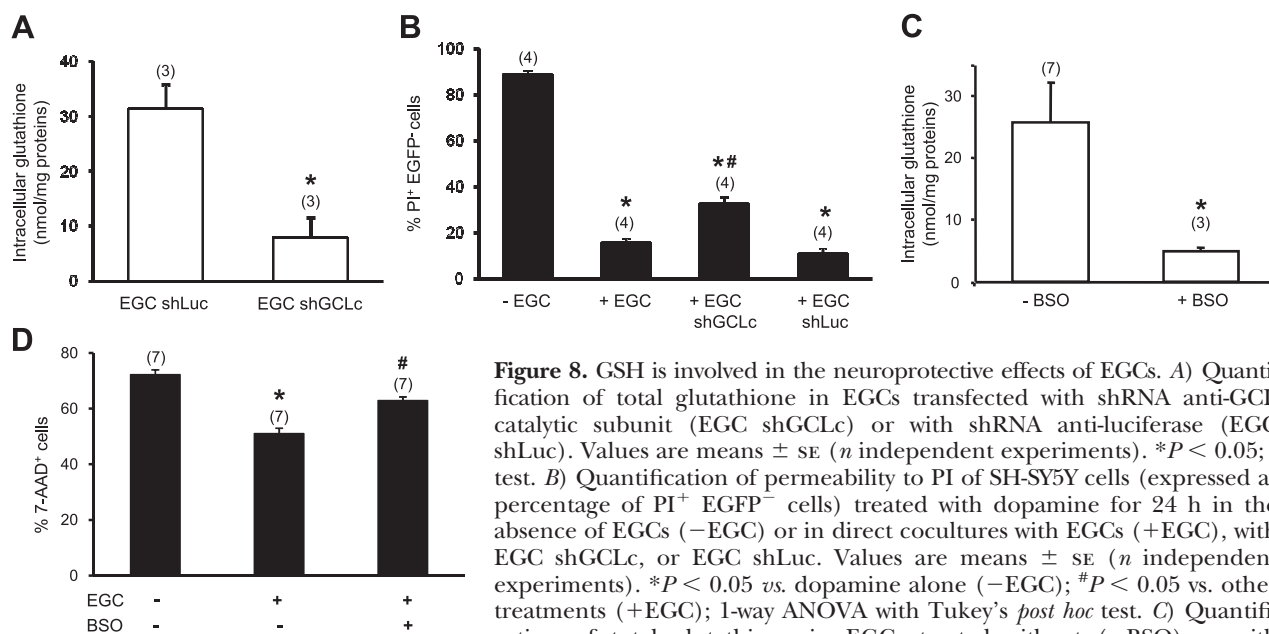


Figure 8. GSH is involved in the neuroprotective effects of EGCs. *A*) Quantification of total glutathione in EGCs transfected with shRNA anti-GCL catalytic subunit (EGC shGCLc) or with shRNA anti-luciferase (EGC shLuc). Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05; *t* test. *B*) Quantification of permeability to PI of SH-SY5Y cells (expressed as percentage of PI⁺ EGFP⁻ cells) treated with dopamine for 24 h in the absence of EGCs (-EGC) or in direct cocultures with EGCs (+EGC), with EGC shGCLc, or EGC shLuc. Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05 vs. dopamine alone (-EGC); #*P* < 0.05 vs. other treatments (+EGC); 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. *C*) Quantification of total glutathione in EGCs treated without (-BSO) or with

L-buthionine sulfoximine (+BSO). Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05; *t* test. *D*) Quantification of cell permeability to 7-AAD of SH-SY5Y cells treated with dopamine in the absence of EGCs or in indirect cocultures with EGCs treated or not with BSO. Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05 vs. dopamine alone (-EGC, -BSO); #*P* < 0.05 vs. other EGC treatment (+EGC, -BSO); 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test).

GSH protects myenteric neurons against H₂O₂-induced cell death

Finally, we aimed to characterize whether in an integrated model, *i.e.*, in explants of rat colon, oxidative stress could induce enteric neuronal cell death and whether GSH could be neuroprotective. Treatment of colonic explants with H₂O₂ (1 mM) induced a significant increase of the proportion of active caspase 3-IR myenteric neurons (28 \pm 5% of Hu-IR neurons) as compared to controls (4 \pm 1%; *n*=4; *P*<0.05) (Fig. 9A-D, I). The H₂O₂-induced caspase3-IR in myenteric neurons was significantly reduced (11 \pm 3%; *n*=4) by GSH (5 mM) (Fig. 9E-I).

DISCUSSION

The present study identified a novel neuroprotective role for enteric glia in the ENS. *In vitro* conditional ablation of EGCs led to a reduced neuronal survival as well as an increase in neuronal lesions during oxidative stress. We next identified GSH as an enteric glia-derived mediator responsible for their neuroprotective effects. Eventually, neuroprotective effects of GSH were also demonstrated using *ex vivo* explants of rat colon. Altogether these data further extend the functional and morphological similarities between astrocytes and enteric glia in the control of neuronal homeostasis.

A major finding of our study was the demonstration of the direct neuroprotective role of EGCs. Indeed, previous *in vivo* studies have yielded controversial results about the putative neuroprotective role of EGCs. Although Bush *et al.* (10) have evidenced neuronal loss

following *in vivo* glia ablation, no such loss was observed in another model of glia ablation (17). These discrepancies could be explained in part by the fact that following EGC ablation, survival of mice was significantly reduced to 4–5 d in the model of Cornet *et al.* (17) as compared to 19 d in the model established by Bush *et al.* (10). Such a difference in time course could either facilitate the development of the neurodegenerative process or modulate the neuroprotection induced by environmental constituents of the ENS. It has been recently shown that intestinal epithelial cells were also protective for enteric neurons during oxidative stress (24). In this context we have established an *in vitro* primary culture of ENS (20), devoid of its environmental constituents, that enabled us to investigate the direct neuroprotective effects of EGCs. A similar model has been used to demonstrate the involvement of EGCs in purinergic neurotransmission (25) and gave results comparable to the ones that were obtained *ex vivo* (26). Interestingly, following conditional ablation of glia in our primary cultures of ENS, the number of neurons per ganglia was reduced and was associated with an increase in the release of NSE. This is in line with experiments performed in the CNS in which a major loss of neurons was observed following astrocyte ablation (27, 28). This neuronal loss was probably due to the decrease in the expression of glia-derived glutamate transporters GLAST and GLT-1 (27). In our case, the mechanisms responsible for neuronal cell loss remain unknown but could be due to reduced availability of 1) glia-derived neurotrophic factors or 2) neuroprotective factors, because one cannot exclude the presence of low level of oxidative stress sufficient to induce neuronal cell death in control conditions. This reduced

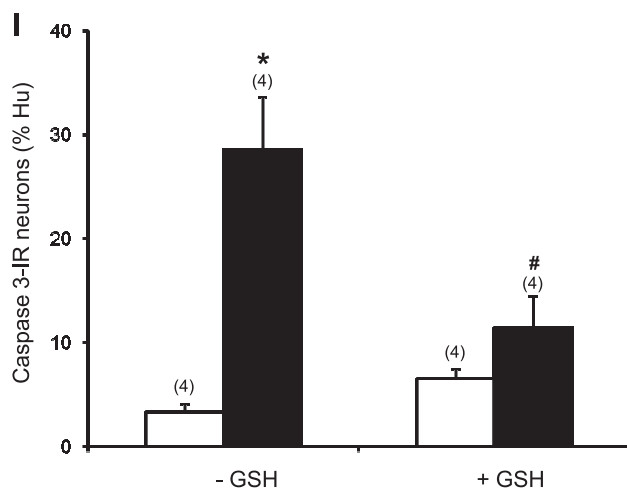
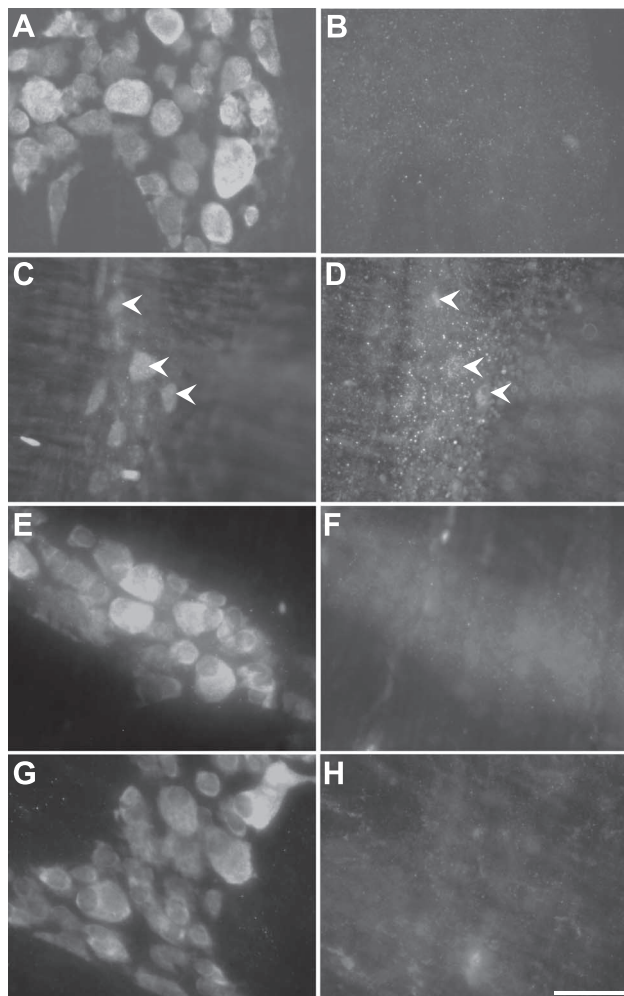


Figure 9. GSH prevents apoptotic neuronal death induced by oxidative stress in rat myenteric plexus. *A–H*) Images of whole mounts of myenteric neurons treated without H₂O₂ (*A, B, E, F*) or with H₂O₂ (*C, D, G, H*) in the presence (*E–H*) or absence (*A–D*) of GSH. Whole mounts were stained with antibodies against Hu (*A, C, E, G*) and active caspase-3 (*B, D, F, H*). Arrows indicate colocalization of active caspase 3 with Hu. *I*) Quantitative analysis of the proportion of active caspase-3-IR myenteric neurons *vs.* total neurons identified with Hu (10 ganglia/condition). Values are means \pm SE (*n* independent experiments). **P* < 0.05 *vs.* control; #*P* < 0.05 *vs.* other treatment; 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test.

neuroprotection under basal conditions could lead to an increase in susceptibility of neurons to insults such as oxidative stress, as observed in our study.

Another important finding of our study was the identification of GSH as an enteric glia-derived mediator responsible for their neuroprotective effects. This further extends the role of glia-derived GSH and its derivatives in the regulation of gut homeostasis. Indeed, Savidge *et al.* (9) identified GSH and its derivatives (GSSG and GSNO) as being produced by EGCs and revealed GSNO as a key regulator involved in intestinal barrier homeostasis. In the ENS, GSH has been shown to decrease the proportion of myenteric neurons expressing nitric oxide synthase in the colon and expressing vasoactive intestinal peptide in the ileum (29). In addition, GSH also prevented the decrease in nitrergic neurons induced by NO. This drop in the proportion of nitrergic neurons was not associated with cell death, suggesting that GSH modified the neurochemical phenotype (30). Regarding neuroprotection, GSH has been identified in the CNS as being synthesized by astrocytes and exerting neuroprotective effects, especially during oxidative stress (31). In our study, we have provided evidence that GSH was able to prevent the neuronal damages induced by oxidative stress mainly through an extracellular mechanism. Pretreatment of SH-SY5Y or primary cultures of ENS with GSH was not sufficient to protect them from the oxidative insult. This protection was only achieved when GSH was present *concomitantly* during oxidative stress. The precise neuroprotective mechanisms of GSH in our study remain unknown. Nevertheless, on the basis of previous works, it can be postulated that GSH could prevent the production of reactive oxygen species in the presence of specific enzymes such as glutathione peroxidases (32) or selenoprotein P (33). Furthermore, GSH could also be a source of sulfhydryl species that could further be used by neurons for intracellular GSH synthesis (34, 35). Although EGCs are not the only cells of the ENS environment capable of producing glutathione, their structural organization within the ENS makes them a candidate of choice to protect neurons. EGCs are densely and closely distributed within enteric ganglia, outnumbering neurons by a factor of 5:1, and are located within a few nanometers of neuronal cell bodies and processes. This could allow a rapid and tight control of the extracellular microenvironment of the neuron by glia-released glutathione. In our study, the neuroprotective effects of EGCs were only partly dependent on glutathione, implying that other factors secreted by EGCs are probably also involved. Although astrocytes are a well-recognized source of neuroprotective factors in the CNS, identification of such factors in EGCs remains largely unknown. Recent studies have shown that nerve growth factor (NGF) and transforming growth factor-beta 1 (TGFβ1) are secreted by EGCs (8, 36). These factors have been shown to exert neuroprotective effects in the CNS, but their role in the ENS is largely unknown. Nevertheless our preliminary results suggest that this is

not the case in the ENS and that TGF β 1 is not able to protect enteric neurons in primary cultures following an oxidative challenge.

Finally, an interesting finding of our study was that adenoviral transduction of ENS using CMV promoter allowed a highly selective targeting of EGCs. The precise mechanisms involved remain unknown but could be due in part to the specific expression of CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) by EGCs (unpublished results). This finding is also in line with two recent studies that showed high expression of CMV promoter in astrocytes (37) and specific viral targeting of EGCs in patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction (38).

An emerging concept in gastroenterology is that a wide range of diseases, for example, motility disorders and inflammation, can be considered in part as enteric neuropathies. Until recently, studies of enteric neuropathies have mainly focused on enteric neurons and especially on changes in the neurochemical phenotype (39). Scarce, but increasing, data suggest that EGCs are also major players in gut disease (40). For instance, it has been recently evidenced that motor disorders of the gut, such as slow transit constipation, diverticular disease, and idiopathic megacolon, are associated with enteric glial abnormalities (13, 14). Our present results provide further insights into the role of EGCs in the field of enteric neuropathies, demonstrating for the first time that EGCs are directly involved in the survival of enteric neurons. This neuroprotective role for EGCs is likely to be critical in the context of the gut because enteric neurons, in contrast to CNS neurons, are directly in contact with the environment and thus exposed in first line to nutritional and inflammatory insults. In this context, we have recently shown that protection of neurons in the gut is not restricted to EGC, because intestinal epithelial cells (IECs) are also able to prevent the neuronal cell death induced by dopamine (24). It is thus tempting to speculate that both IECs and EGCs act in concert to protect enteric neurons, and therapeutic strategies that aim at reinforcing the neuroprotective properties of these two cell types will be of interest in the management of enteric neuropathies. FJ

H.A. was supported by a grant from Inserm Pays de la Loire and SanTDige Foundation. M.N. and P.D. were supported by a contrat d'interface Inserm. B.L. is funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

REFERENCES

1. Benarroch, E. E. (2007) Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* **69**, 1953–1957
2. Schemann, M., and Neunlist, M. (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* **16**(Suppl. 1), 55–59
3. Ferri, G. L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P. J., and 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
4. Gabella, G. (1981) Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* **6**, 425–436

5. Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* **286**, 736–737
6. Bassotti, G., Villanacci, V., Antonelli, E., Morelli, A., and Salerni, B. (2007) Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab. Invest.* **87**, 628–632
7. Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., and Savidge, T. (2008) Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* **263**, 577–583
8. Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., Paris, F., and Galmiche, J. P. (2007) Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G231–G241
9. Savidge, T. C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M. V. (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358
10. 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
11. 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
12. Bassotti, G., Battaglia, E., Bellone, G., Dughera, L., Fisogni, S., Zambelli, C., Morelli, A., Mioli, P., Emanuelli, G., and Villanacci, V. (2005) Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J. Clin. Pathol.* **58**, 973–977
13. Bassotti, G., Villanacci, V., Cathomas, G., Maurer, C. A., Fisogni, S., Cadei, M., Baron, L., Morelli, A., Valloncini, E., and Salerni, B. (2006) Enteric neuropathology of the terminal ileum in patients with intractable slow-transit constipation. *Hum. Pathol.* **37**, 1252–1258
14. Bassotti, G., Villanacci, V., Maurer, C. A., Fisogni, S., Di Fabio, F., Cadei, M., Morelli, A., Panagiotis, T., Cathomas, G., and 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
15. Anitha, M., Chandrasekharan, B., Salgado, J. R., Grouzmann, E., Mwangi, S., Sitaraman, S. V., and Srinivasan, S. (2006) Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology* **131**, 1164–1178
16. Anitha, M., Gondha, C., Sutliff, R., Parsadanian, A., Mwangi, S., Sitaraman, S. V., and Srinivasan, S. (2006) GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* **116**, 344–356
17. 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. U. S. A.* **98**, 13306–13311
18. Rühl, A., Trotter, J., and 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
19. Diaz-Hernandez, J. I., Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Fernandez, E., and Bolanos, J. P. (2005) Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J. Biol. Chem.* **280**, 38992–39001
20. Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinar, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., and Neunlist, M. (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol.* **586**, 1963–1975
21. Frank, K. B., Chiou, J. F., and Cheng, Y. C. (1984) Interaction of herpes simplex virus-induced DNA polymerase with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **259**, 1566–1569
22. Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R., and Evans, R. M. (1989) Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2698–2702

23. Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., and Dichgans, J. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4904–4911
24. Moriez, R., Abdo, H., Chaumette, T., Faure, M., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2009) Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: role of epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 577–582
25. Gomes, P., Chevalier, J., Boesmans, W., Roosen, L., van den Abbeel, V., Neunlist, M., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2009) ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. *Neurogastroenterol. Motil.* **21**, 870–e62
26. Gulbransen, B. D., and Sharkey, K. A. (2009) Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* **136**, 1349–1358
27. Cui, W., Allen, N. D., Skynner, M., Gusterson, B., and Clark, A. J. (2001) Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* **34**, 272–282
28. Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostendorf, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H., and Sofroniew, M. V. (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297–308
29. Koch, T. R., Fink, J. G., Ruan, E., Petro, A., and Opara, E. C. (1997) Chronic glutathione depletion alters expression of enteric inhibitory neurochemicals in the mouse. *Neurosci. Lett.* **235**, 77–80
30. Zandecki, M., Raeymaekers, P., Janssens, J., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2006) The effect of nitric oxide donors on nitric oxide synthase-expressing myenteric neurones in culture. *Neurogastroenterol. Motil.* **18**, 307–315
31. Desagher, S., Glowinski, J., and Premont, J. (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 2553–2562
32. Arthur, J. R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 1825–1835
33. Yang, X., Hill, K. E., Maguire, M. J., and Burk, R. F. (2000) Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 390–396
34. Shih, A. Y., Johnson, D. A., Wong, G., Kraft, A. D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J. A., and Murphy, T. H. (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* **23**, 3394–3406
35. Shih, A. Y., Li, P., and Murphy, T. H. (2005) A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J. Neurosci.* **25**, 10321–10335
36. Von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K. H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006) Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J. Neuroendocrinol.* **18**, 820–825
37. Boulos, S., Meloni, B. P., Arthur, P. G., Bojarski, C., and Knuckey, N. W. (2006) Assessment of CMV, RSV and SYN1 promoters and the woodchuck post-transcriptional regulatory element in adenovirus vectors for transgene expression in cortical neuronal cultures. *Brain Res.* **1102**, 27–38
38. Selgrad, M., De Giorgio, R., Fini, L., Cogliandro, R. F., Williams, S., Stanghellini, V., Barbara, G., Tonini, M., Corinaldesi, R., Genta, R. M., Domiati-Saad, R., Meyer, R., Goel, A., Boland, C. R., and Ricciardiello, L. (2009) JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* **58**, 25–32
39. Neunlist, M., Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P. A., Schemann, M., and Galmiche, J. P. (2003) Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**, 84–90
40. Savidge, T. C., Sofroniew, M. V., and Neunlist, M. (2007) Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab. Invest.* **87**, 731–736

*Received for publication June 16, 2009.
Accepted for publication October 22, 2009.*

Article 2 : Neuroprotection par les cellules gliales entériques : effets à long terme et rôle de la prostaglandine 15d-PGJ₂

La cellule gliale entérique (CGE), composante majeure du système nerveux entérique (SNE), présente des similitudes morphologiques et fonctionnelles avec l'astrocyte du système nerveux central (SNC). Le rôle des astrocytes dans la régulation des fonctions neuronales a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré l'implication de ces cellules dans le contrôle de la neurogénèse, de la neurotransmission et de la survie neuronale (Jessen 2004).

Quelques études ont montré des fonctions similaires des CGE mais ces cellules restent très peu connues. Nous avons mis en évidence au cours de la première étude le rôle important que jouent les CGE dans le contrôle de la survie neuronale en partie via la production de glutathion réduit. Cependant, cette voie n'est certainement pas la seule impliquée et le glutathion réduit ne permet pas de bloquer complètement la mort neuronale induite par un stress oxydant. En particulier, certains des effets neuroprotecteurs à long terme des CGE ne sont pas médiés par le glutathion.

Par conséquent, nous avons voulu étudier les autres voies impliquées dans la neuroprotection par les CGE, et notamment les mécanismes impliqués dans la protection à long terme et la prévention de la mort neuronale. En outre nous avons cherché à identifier les facteurs responsables de ces effets à long terme. Parmi les différents facteurs testés, notre étude s'est focalisée sur une molécule identifiée récemment comme étant produite et libérée par les CGE, la prostaglandine 15d-PGJ₂ (Bach et al, en préparation). Cette molécule, dérivée des oméga-6, est impliquée dans différentes fonctions physiologiques. La 15d-PGJ₂ a en particulier des effets neuroprotecteurs dans le SNC contre différents types de stress comme le

stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le stress nitrosylant et le stress induit par le glutamate (Aoun et al. 2003; Lim et al. 2004). Par ailleurs la 15d-PGJ₂ permet également de prévenir la mort neuronale induite dans un modèle d'ischémie/reperfusion, à la fois dans le cerveau et dans l'intestin (Cuzzocrea et al. 2003; Lin et al. 2006; Baregamian et al. 2009).

L'objectif de cet article a donc été de caractériser les effets protecteurs à long terme des CGE et de mettre en évidence l'implication de la 15-PGJ₂ dans ces effets.

Une co-culture pendant 1 à 4 jours de la lignée neuronale SH-SY5Y avec des lignées gliales est réalisée préalablement au traitement par H_2O_2 . Cette co-culture préalable protège durablement les cellules SH-SY5Y vis-à-vis du stress oxydant appliqué après retrait des CGE. Après avoir testé différents facteurs gliaux, nous montrons que le prétraitement des cellules SH-SY5Y avec des doses croissantes de 15d-PGJ₂ pendant 24h permet une réduction de la perméabilité membranaire induite par le H_2O_2 à 200 μ M. Cet effet est dose-dépendant avec un effet maximal observé à 5 μ M et un effet toxique au-delà. Les effets de la 15d-PGJ₂ dépendent également de la durée de pré-traitement. Un traitement répétitif pendant 4 jours, reproduisant les conditions de co-culture, protège les cellules SH-SY5Y. Une neuroprotection maximale est observée après 24 heures de prétraitement. Néanmoins, les effets de la 15d-PGJ₂ sur les cultures primaires de SNE sont obtenus uniquement avec de faibles doses (1-3 μ M).

Afin de mettre en évidence l'implication de la 15d-PGJ₂ dans les effets préventifs des CGE, nous avons utilisé une approche génétique basée sur l'inhibition de la synthèse de la 15d-PGJ₂ par ARN interférence. Les lignées de CGE ont été transfectées avec des plasmides exprimant des shARN dirigés contre la PGD synthase, enzyme responsable de la production de 15d-PGJ₂. Le traitement à la puromycine (1 μ g/ml) a permis de sélectionner une population de cellules résistantes ayant une expression stable de shRNA. Ceci a été vérifié par des mesures protéomiques de la PGD synthase. Nous avons montré que parmi les différentes

constructions testées, deux d'entre elles présentaient une réduction significative de la protéine (CGE shPGDS) et une troisième construction ne présentait aucune variation et a servi de contrôle négatif (CGE shMOCK) pour le reste de l'étude.

Suite à une co-culture pendant 4 jours des cellules SH-SY5Y avec des CGE shPGDS et CGE shMOCK, l'analyse de la perméabilité membranaire montre que les effets protecteurs obtenus avec des CGE non transfectées lors d'un stress oxydant sont significativement réduits suite à une co-culture avec les CGE shPGDS alors qu'aucune variation n'est observée avec les CGE shMOCK. Cette inhibition partielle des effets préventifs des CGE confirme que la 15d-PGJ₂ est responsable au moins en partie de ces effets.

La prostaglandine 15d-PGJ₂ est impliquée dans différentes voies de signalisation (Straus and Glass 2001). On distingue principalement la voie permettant l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma). Les effets physiologiques peuvent également impliquer d'autres voies comme la voie Nrf-2 qui est activée par la 15d-PGJ₂ ou la voie NF κ B qui est inhibée par la 15d-PGJ₂.

Pour déterminer si la voie PPAR γ est responsable des effets protecteurs observés de la 15d-PGJ₂, une approche pharmacologique a été choisie. Les cellules SH-SY5Y ont été incubées en présence de rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ . L'analyse de la perméabilité membranaire montre que le rosiglitazone est incapable de reproduire les effets protecteurs de la 15d-PGJ₂. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec un inhibiteur spécifique de PPAR γ , le GW9662. Le traitement de ces cellules avec 5 μ M de 15d-PGJ₂ en présence de GW9662 ne modifie pas ses effets protecteurs de la mort neuronale induite par l'H₂O₂. L'utilisation de ces deux molécules laisse supposer que les effets protecteurs de la 15d-PGJ₂ sont probablement indépendants de la voie PPAR γ .

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un deuxième mécanisme de neuroprotection par les CGE. Ce mécanisme est complémentaire au

premier et agirait plutôt à long terme en augmentant les capacités de défense de la cellule neuronale qui devient plus résistante au stress oxydant.

L'un des médiateurs impliqués dans ces effets est la 15d-PGJ₂, dont les effets sont indépendants de la voie PPAR γ . Les voies activées par la 15d-PGJ₂ ou d'une façon plus générale par les CGE en co-culture restent cependant inconnues. Des expériences en cours permettront d'identifier les différents gènes modulés à la fois par les CGE et par la 15d-PGJ₂. Il pourrait s'agir de gènes antioxydants activés par le facteur de transcription Nrf-2 ou de gènes de la voie apoptotique modulés par NF κ B.

Enfin, l'identification de la 15d-PGJ₂ comme élément majeur de neuroprotection permettrait d'utiliser cette molécule en thérapeutique. Des apports nutritionnels en dérivés des oméga-6 pourraient en effet être bénéfiques dans un contexte de neuropathie entérique.

The omega-6 derivative 15d-PGJ2 is involved in the neuroprotective effects of enteric glial cells

Hind Abdo^{1,2,3}, Pascal Derkinderen^{1,2,4}, Maxime Mahé^{1,2,3}, Kalyane Bach-Ngohou^{1,2,3}, Michel Neunlist^{1,2,3} and Bernard Lardeux^{1,2,3}.

1) INSERM, U913, Nantes, F-44000 France

2) Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France

3) CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44000 France

4) CHU Nantes, Service de Neurologie, Nantes, F-44000 France

Address correspondence to: Corresponding author

Bernard Lardeux, PhD INSERM U913 1, place Alexis Ricordeau 44093 Nantes. Tel:

0033(0)240087522 Fax: 0033(0)240087506; E-mail: bernard.lardeux@univ-nantes.fr

Abstract

Background and aims: Increasing evidence suggests that enteric glial cells (EGC) are critical for enteric neurons functions. We have shown in a previous study that EGC have a direct neuroprotective effect against oxidative stress, partially mediated by the release of reduced glutathione. However, other factors are likely to be involved. EGC are able to produce and secrete the ω -6 derivative 15d- $\Delta^{12, 14}$ prostaglandin J2 (15d-PGJ₂), a natural agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) shown to be neuroprotective in the central nervous system. Therefore, the aim of this study was to assess the potential involvement of the prostaglandin 15d-PGJ₂ in the neuroprotective effects of EGC.

Methods: Primary cultures of ENS, single cultures of neuroblastoma SH-SY5Y cells or Transwell co-cultures of EGC along with SH-SY5Y cells were used. Oxidative stress was induced by 200 μ M hydrogen peroxide for 24h. Neuronal cell viability was assessed by flow cytometry quantification of 7-AAD-permeable cells and dosage of released neuron specific enolase. Prostaglandin D2 synthase (PGDS) gene expression was silenced by RNA interference, and PGDS expression level was assessed by Western blot.

Results: When EGC were co-cultured along with SH-SY5Y and removed prior to H₂O₂ treatment, a 60% decrease in neuronal death was observed. Similarly, a 24 and 96h pre-treatment of SH-SY5H cells with 5 μ M 15d-PGJ₂ prevented 70% of the neuronal death induced by oxidative stress. These protective effects of 15d-PGJ₂ were replicated in primary cultures of ENS. Invalidation of PGDS, the terminal enzymatic component responsible for 15-d-PGJ₂ production, significantly attenuated the neuroprotective effects of EGC in the co-culture model. Pharmacological modulation of PPAR γ did not influence EGC neuroprotection.

Conclusion: This study demonstrates a new preventive and long-term neuroprotective role of EGC against oxidative stress, partially mediated by 15d-PGJ₂ via a PPAR γ -independent pathway.

Introduction

The enteric nervous system (ENS) is an integrative neuronal network located within the gastrointestinal tract controlling gastrointestinal functions such as motility and secretion [1]. The ENS is composed of enteric neurons and enteric glial cells (EGC). EGC largely outnumber neurons [2] and are likely to represent the ENS counterpart of central nervous system (CNS) astrocytes since they resemble astrocytes both morphologically and immunohistochemically [3-5].

In contrast to CNS astrocytes, whose neuroprotective effects have been extensively characterized [6, 7], the protection of enteric neurons by EGC has been poorly studied. There is mounting evidence suggesting that EGC are involved in digestive diseases characterized by neurodegenerative features, such as slow transit constipation, idiopathic megacolon and colonic diverticular disease [8-10]. Transgenic models in which enteric glia is ablated [11, 12] display a shift in the neurochemical phenotype [12, 13] or a neuronal loss [11]. In a recent study, using *in vitro* co-culture models, we have further shown that EGC decreased neuronal death both in basal condition and during oxidative stress. Taken as a whole, these data suggest that the EGC could be directly involved in the regulation of plasticity and survival of enteric neurons.

In our co-culture model, the neuroprotective effects of EGC were partially mediated by reduced glutathione (GSH). Nevertheless, GSH alone did not recapitulate the neuroprotection achieved by EGC, suggesting that other factors are involved. We have recently shown that EGC can produce and release the ω -6 derivative 15d- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), which modulates epithelial cell proliferation via the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) pathway (unpublished data). 15d-PGJ₂ has been shown to protect neuronal cell lines from oxidative stress and excitotoxicity *in vitro* [14, 15]. The aim of the present research is thus to determine whether 15d-PGJ₂ is involved in the neuroprotective effects of EGC. Using a co-culture model, we show that a pre-incubation of neuronal cells with EGC is sufficient to protect neuronal cells from oxidative stress. We further provide strong evidence that these effects are mediated by 15d-PGJ₂.

Materials & methods

Cell culture models

Enteric glial cells (EGC)

Transformed EGC (CRL2690) were purchased from ATCC. Non-transformed EGC (NT) were obtained from Dr A. Rühl and prepared as previously described [16]. EGC were cultured in DMEM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS, BioWest), 1% (v/v) glutamine (Invitrogen), 50 µg/mL Streptomycin (Invitrogen) and 50 U/mL Penicillin (Invitrogen).

PGD2 synthase deficient enteric glial cell lines

Non-transformed EGC (NT) were transfected with pLKO.1-puro shPTGDS vector plasmids coding for the shRNA against Prostaglandin D2 synthase (shPTGDS) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Cell transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Medium was renewed after 24 hours and cells were treated with puromycin (10 µg/mL, Invitrogen) until stable expression of transgene. Efficient shRNA sequence was: **shPTGDS CCGGCCAGTG TGAGACCAAGATCATCTCGAGATGATCTTGGTCTCACCTGGTTTTT**. An unefficient shRNA construction and was used as a negative control (sh Mock **CCGGG CCGGACTTTCAACAAGACAACCTCGAGTTGTCTTGTTGAAAGTTGGGCTTTTT**).

Neuroblastoma cell line

Neuroblastoma SH-SY5Y cells were purchased from ATCC and maintained in SH medium: DMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 15% (v/v) FBS, 1% (v/v) glutamine, 1% (v/v) non essential amino acids (Invitrogen), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin.

Co-culture experiments

EGC or shPTGDS EGC were seeded onto porous filters (12-well Transwell Clear, 0.40 μm -porosity, Corning) at a density of $0,16 \times 10^5$ cells/cm². After 24 hours, EGC filters were placed in presence of SH-SY5Y ($0,16 \times 10^5$ cells/cm²) seeded into the bottom of 12-well plates and cultured for 24, 48, 72 or 96 hours before a 24 hours treatment with H₂O₂ (Figure 1A).

Primary cultures of ENS

Intestines of E15 rat embryos (35-45 embryos per isolation from 3 pregnant Sprague-Dawley rats (CERJ, Le Genest St Isle, France) were removed and finely diced in Hank's buffered salt solution (Sigma) supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin and 50 U/mL Penicillin and kept on ice. Intestines were triturated mechanically using a scalpel. Tissue fragments were collected with 5 mL DMEM/F12 (1:1) medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 50 U/mL penicillin, and digested at 37°C for 15 min in the presence of 0,1% (v/v) Trypsin (Sigma). The Trypsin reaction was stopped by adding 10 mL of medium containing 10% (v/v) FBS. The suspension was then treated by 0,01% (v/v) DNase I (Sigma) for 10 min at 37°C. After trituration, cells were centrifuged at 75xg for 10 min. Cells were counted and seeded in DMEM/F12 with antibiotics and 10% (v/v) FBS at a density of 2.4×10^5 cells/cm², on 24-well plates previously coated for 6 hours with a solution of 1% (v/v) gelatine (Sigma). After 24 hours, the medium was replaced with the same medium without FBS but containing 1% of N-2 supplement (Invitrogen). Half of the medium was replaced every other day and primary cultures were maintained for 13 days.

Assessment of cell viability

Immunohistochemical analysis

Primary cultures of ENS were fixed in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature for 1 hour. Cells then washed in PBS and permeabilized for 30 min in PBS/NaN₃ containing 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) and 4% (v/v) horse serum before incubation with mouse β -tubulin III antibody (1:1000, Sigma) for 90 min. Cells were then washed in PBS and

incubated for 30 min with donkey anti-mouse IgG conjugated to carboxymethylindocyanine (1:500; Jackson Laboratories, purchased from Immunotech, Marseille, France).

Flow cytometry analysis of 7-AAD permeable cells

SH-SY5Y cells were collected both in the supernatant and in the bottom of the wells following treatment with trypsin-EDTA. Cell suspension was then centrifuged for 5 min at 550xg and resuspended in 500 μ L 0.1 M PBS. Membrane permeability was evaluated using 7-amino-actinomycin D (7-AAD) as DNA fluorescent marker. 200 μ L of cell suspension were incubated with 7-AAD for 10 min before flow cytometry using BD FACSSarray (Le pont de Claix, France) for SH-SY5Y cells. Results were expressed as percentage of total cells.

Western blot

EGC transfected or not with shRNA PTGDS plasmids were cultured until confluence and then lysed with RIPA (Millipore) completed with proteases inhibitors (Complete, Roche). After scratching wells, insoluble material was removed by centrifugation and soluble fraction was denaturated for 10 min. Samples were processed for electrophoresis using NuPAGE MES SDS buffer kit (Invitrogen). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in Tris buffer saline with 5% non-fat dry milk. Rabbit anti-PGDS (1:1000, Sigma) and mouse anti- β -actin antibodies (1:5000; Sigma) were used in this study. Immunoblots were probed with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) and visualized by chemiluminescence (ECL plus, Amersham). To quantify the bands, we applied ImageJ software based analysis (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The area under curve (AUC) of PGDS signal was corrected for the AUC of β -actin signal.

Reagents

15d-PGJ2, hydrogen peroxide, Rosiglitazone and GW9662 were all purchased from Sigma. 7-amino actinomycin D (7-AAD) was purchased from BD Bioscience.

Statistics

Data are expressed as means \pm SEM and results were analysed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test or by t-test (as indicated in the legends to figures). SigmaStat software was used for statistical analysis.

Results

Preincubation with EGC protects neuronal cells from oxidative stress

Using a co-culture model, we have recently shown that EGC are neuroprotective during oxidative stress. In this paradigm, the EGC were co-cultured along with the neuronal cells throughout the oxidative insult. In order to determine whether the EGC are also able to achieve “long term” neuroprotection, we have set up an experimental protocol in which EGC are initially co-cultured with SH-SY5Y cells neuronal cells for 24h, 48h, 72h or 96h and removed prior to oxidative stress treatment (Figure 1A). Treatment of SH-SY5Y cells with hydrogen peroxide (H_2O_2 200 μM) during 24h induced a significant increase in cell permeability (60.8 ± 0.8 %) as compared to control condition ($7.7 \pm 0.5\%$) (Figure 1B). This percentage was significantly reduced after long-term co-culture with EGC in a time dependent manner, with a maximum effect after 96h of previous co-culture (19.9 ± 2.4 %) (Figure 1B). In contrast, co-culture with SH-SY5Y cells during 96h did not have any effect on cell permeability (64.1 ± 1.3 %) (Figure 1B).

Preincubation with 15d-PGJ₂ protects neuronal cells from oxidative stress

SH-SY5Y cells were treated with 15d-PGJ₂ for 24h before addition of 200 μM H_2O_2 . Pre-treatment with 5 μM 15d-PGJ₂ significantly reduced cell permeability as compared to control (Figure 2A). Higher concentrations of 15d-PGJ₂ had a toxic effect on SH-SY5Y cells (data not shown). In order to study whether a pre-incubation with 15d-PGJ₂ is sufficient to mediate its neuroprotective effect, 5 μM 15d-PGJ₂ was added in SH-SY5Y medium for 96h, and then removed prior to H_2O_2 addition (Figure 2B). Such a preincubation significantly reduced cell permeability as compared to controls.

15d-PGJ₂ protects primary cultures of enteric nervous system (ENS) from oxidative stress

To assess the putative neuroprotective effects of 15d-PGJ₂ on enteric neurons, primary cultures of ENS were treated with 1, 2 or 3 μM 15d-PGJ₂ for 96h before addition of 200 μM H_2O_2 during

24h. Treatment with H₂O₂ induced a sharp disruption of β -tubulin III network (Figure 3B) as compared to control (Figure 3A). Pre-treatment with 15d-PGJ₂ prevented β -tubulin III alterations in enteric neurons (Figures 5C-5E). In addition, the H₂O₂-induced increase in NSE release was significantly reduced in the presence of 15d-PGJ₂ in a concentration-dependent manner (figure 3F). Higher concentrations of 15d-PGJ₂ had a toxic effect (data not shown).

PGD synthase specific inhibition reduced long term neuroprotection by EGC

We next aimed at determining if 15d-PGJ₂ is involved in the protective effects observed following a preincubation with EGC. To do so, we silenced the expression of PGD₂ synthase (PGDS), the terminal enzymatic component responsible for 15-d-PGJ₂ production. EGC cell lines were transfected with plasmids expressing sh RNA against PGDS gene (pLKO.1-puro shPTGDS). PGDS protein level was decreased in EGC transfected with shPTGDS (EGC shPTGDS) (Figure 4A), and remained constant in EGC transfected with mock shRNA construction (EGC shMOCK).

SH-SY5Y cells were next co-cultured either with non-transfected EGC, EGC shPTGDS or EGC shMOCK (expressing MOCK sh RNA construction) during 96h and treated with H₂O₂ after removal of EGC filters. The decreased proportion of permeable cells observed following co-culture with non-transfected EGC was partially abolished when SH-SY5Y cells were co-cultured with EGC shPTGDS. EGC shMOCK had no effect as compared to non-transfected EGC (Figure 4B).

15d-PGJ₂ effects are independent of PPAR γ pathway

15d-PGJ₂ is the natural ligand of PPAR γ receptor. In order to determine if 15d-PGJ₂ protective effects were mediated by this pathway, SH-SY5Y cells were pre-treated with PPAR γ agonist rosiglitazone during 24h before treatment with 200 μ M H₂O₂. Pre-treatment with 5 μ M rosiglitazone was not able to reproduce the protective effects of 15d-PGJ₂ assessed by 7-AAD permeability (Figure 5A).

Likewise, treatment of SH-SY5Y cells with 10 μ M of the specific PPAR γ inhibitor GW9662 prior to 15d-PGJ2 treatment did not prevent the protective effects of 15d-PGJ2 (Figure 5B).

Discussion

We have shown in the present study that the neuroprotective functions of EGC partly occur through a preventive pathway, since the mere preincubation of neuroblastoma cells with EGC was sufficient to protect them from an oxidative insult. In a recent report, we have identified GSH as one of the soluble factor responsible for the neuroprotective effects of EGC. However, the protective effects of GSH were due to a direct and extracellular mechanism that did not require any previous incubation. Here we provide evidence that another mechanism, which consists on priming neurons in order to enhance their defense capacities, is also involved in the neuroprotection by EGC. Remarkably, a similar mechanism has been characterized in the CNS, based on the induction of specific genes expression by neurons [17-19]. Likewise, preincubation with neurotrophic factors secreted by astrocytes promotes the survival of dopaminergic neurons after an oxidative insult [20].

Another major finding of our study was the identification of the ω -6 derivative 15d-PGJ₂ as a glial mediator involved in these neuroprotective effects. 15d-PGJ₂ was shown to exert protective effects in stress situations such as nitrosative stress and excitotoxicity [14, 15, 21]. Protective effects of 15d-PGJ₂ were also characterized in the context of ischemia-reperfusion injury in the brain and in the gut involving anti-inflammatory properties of 15d-PGJ₂ [22, 23]. We have recently shown that EGC can produce and secrete 15d-PGJ₂ (our unpublished results). 15d-PGJ₂ displays multifaceted cellular functions, including anti-inflammatory and cytoprotective functions [24]. Due to the α,β unsaturated moiety present in its cyclopentenone structure, 15d-PGJ₂ can readily react with cellular nucleophiles such as the cysteinyl thiol groups of proteins [25].

15d-PGJ₂ function depends on its concentration and on the intracellular microenvironment. In particular, treatment of neuronal cell lines with 15d-PGJ₂ is neuroprotective at low concentrations and becomes neurotoxic beyond 8 μ M, probably due to the production of ROS and the modification of cellular redox [26]. We found similar effects in our model. Indeed, 5 μ M 15d-PGJ₂ prevented SH-SY5Y cell death induced by H₂O₂, whereas treatment with 10 μ M of 15d-PGJ₂ increased the neuronal death (data not shown). The

neurotoxic effect of 15d-PGJ₂ appeared at lower doses (3 μM) in primary culture of ENS. The serum contained in SH-SY5Y culture medium may account for this discrepancy. Indeed, serum has been shown to contain growth factors [27] and due to its high protein content could buffer 15d-PGJ₂.

15d-PGJ₂ is a high affinity ligand for the nuclear receptor PPAR γ and modulates gene transcription by binding to this receptor [28] but could also modulate other cellular pathways, especially NF κ B and Nrf2 pathways [24, 29]. Using a pharmacological approach, we have shown that the protective effects of 15d-PGJ₂ were independent of PPAR γ pathway in our model. Previous studies have demonstrated a protective role for 15d-PGJ₂ through the activation of PPAR γ [14, 21]. The mechanisms involved in the neuroprotective effects of 15d-PGJ₂ in our context thus remain to be identified. However, it can be postulated that 15d-PGJ₂ produced by EGC could increase the neuronal resistance to oxidative death either by increasing the expression of anti-oxidant genes or by modulating apoptotic gene expression via Nrf2 and/or NF κ B pathways [30, 31].

The identification of this preventive neuroprotection by EGC could be of great interest in the field of enteric neuropathies. Although most of the studies about enteric neuropathies have focused on neurons, there is emerging evidence that EGC are critically involved in the initiation and/or progression of these diseases [8, 10]. The loss of EGC integrity observed during enteric neuropathies could sensitize neurons to environmental insults such as inflammation and oxidative stress. In this context, our findings may open therapeutic avenues. 15d-PGJ₂ and other prostaglandins derive from ω -6 fatty acid arachidonic acid, considered as an essential fatty acid. Nutritional supply of ω -6 could be of help in order to promote neuronal survival by enhancing EGC protective potentials.

In conclusion, our study is the first to bring to light an emerging role for EGC in preventing neuronal death by the modulation of neuronal properties. We demonstrated the neuroprotective capacities of EGC-derived 15d-PGJ₂. Future work will determine the signalling pathways that are involved in this neuroprotection.

References

- [1] R.K. Goyal, I. Hirano, The enteric nervous system, *The New England journal of medicine* 334 (1996) 1106-1115.
- [2] S. Hoff, F. Zeller, C.W. von Weyhern, M. Wegner, M. Schemann, K. Michel, A. Ruhl, Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody, *J Comp Neurol* 509 (2008) 356-371.
- [3] G.L. Ferri, L. Probert, D. Cocchia, F. Michetti, P.J. Marangos, J.M. Polak, Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system, *Nature* 297 (1982) 409-410.
- [4] G. Gabella, Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells, *Neuroscience* 6 (1981) 425-436.
- [5] K.R. Jessen, R. Mirsky, Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein, *Nature* 286 (1980) 736-737.
- [6] R. Dringen, J.M. Gutterer, J. Hirrlinger, Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species, *European journal of biochemistry / FEBS* 267 (2000) 4912-4916.
- [7] K.M. Dhandapani, M. Hadman, L. De Sevilla, M.F. Wade, V.B. Mahesh, D.W. Brann, Astrocyte protection of neurons: role of transforming growth factor-beta signaling via a c-Jun-AP-1 protective pathway, *The Journal of biological chemistry* 278 (2003) 43329-43339.
- [8] G. Bassotti, E. Battaglia, G. Bellone, L. Dughera, S. Fisogni, C. Zambelli, A. Morelli, P. Mioli, G. Emanuelli, V. Villanacci, Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease, *J Clin Pathol* 58 (2005) 973-977.
- [9] G. Bassotti, V. Villanacci, G. Cathomas, C.A. Maurer, S. Fisogni, M. Cadei, L. Baron, A. Morelli, E. Valloncini, B. Salerni, Enteric neuropathology of the terminal ileum in patients with intractable slow-transit constipation, *Hum Pathol* 37 (2006) 1252-1258.
- [10] G. Bassotti, V. Villanacci, C.A. Maurer, S. Fisogni, F. Di Fabio, M. Cadei, A. Morelli, T. Panagiotis, G. Cathomas, B. Salerni, The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation, *Gut* 55 (2006) 41-46.
- [11] T.G. Bush, T.C. Savidge, T.C. Freeman, H.J. Cox, E.A. Campbell, L. Mucke, M.H. Johnson, M.V. Sofroniew, Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice, *Cell* 93 (1998) 189-201.
- [12] A. Cornet, T.C. Savidge, J. Cabarrocas, W.L. Deng, J.F. Colombel, H. Lassmann, P. Desreumaux, R.S. Liblau, Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001) 13306-13311.
- [13] A.C. Aube, J. Cabarrocas, J. Bauer, D. Philippe, P. Aubert, F. Doulay, R. Liblau, J.P. Galmiche, M. Neunlist, Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption, *Gut* 55 (2006) 630-637.
- [14] P. Aoun, D.G. Watson, J.W. Simpkins, Neuroprotective effects of PPARgamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells, *Eur J Pharmacol* 472 (2003) 65-71.
- [15] S.Y. Lim, J.H. Jang, H.K. Na, S.C. Lu, I. Rahman, Y.J. Surh, 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2) protects against nitrosative PC12 cell death through up-regulation of intracellular glutathione synthesis, *The Journal of biological chemistry* 279 (2004) 46263-46270.
- [16] A. Ruhl, S. Franzke, S.M. Collins, W. Stremmel, Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (2001) G1163-1171.
- [17] J. Ding, J.Z. Yu, Q.Y. Li, X. Wang, C.Z. Lu, B.G. Xiao, Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF, *Brain, behavior, and immunity* (2009).

- [18] X. Zhao, R. Strong, J. Zhang, G. Sun, J.Z. Tsien, Z. Cui, J.C. Grotta, J. Aronowski, Neuronal PPAR γ deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia, *J Neurosci* 29 (2009) 6186-6195.
- [19] J. Lewerenz, P. Albrecht, M.L. Tien, N. Henke, S. Karumbayaram, H.I. Kornblum, M. Wiedau-Pazos, D. Schubert, P. Maher, A. Methner, Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro, *Journal of neurochemistry* (2009).
- [20] D. Yang, C. Peng, X. Li, X. Fan, L. Li, M. Ming, S. Chen, W. Le, Pitx3-transfected astrocytes secrete brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor and protect dopamine neurons in mesencephalon cultures, *Journal of neuroscience research* 86 (2008) 3393-3400.
- [21] P. Aoun, J.W. Simpkins, N. Agarwal, Role of PPAR- γ ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells, *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (2003) 2999-3004.
- [22] T.N. Lin, W.M. Cheung, J.S. Wu, J.J. Chen, H. Lin, J.J. Chen, J.Y. Liou, S.K. Shyue, K.K. Wu, 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006) 481-487.
- [23] S. Cuzzocrea, B. Pisano, L. Dugo, A. Ianaro, N.S. Patel, R. Di Paola, T. Genovese, P.K. Chatterjee, M. Di Rosa, A.P. Caputi, C. Thiemermann, Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut, *Br J Pharmacol* 140 (2003) 366-376.
- [24] E.H. Kim, Y.J. Surh, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors, *Biochemical pharmacology* 72 (2006) 1516-1528.
- [25] D.S. Straus, C.K. Glass, Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets, *Medicinal research reviews* 21 (2001) 185-210.
- [26] S.H. Koh, B. Jung, C.W. Song, Y. Kim, Y.S. Kim, S.H. Kim, 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a neuroprotectant or a neurotoxicant?, *Toxicology* 216 (2005) 232-243.
- [27] E.B. Berry, T.A. Sato, M.D. Mitchell, R. Stewart Gilmour, R.J. Helliwell, Differential effects of serum constituents on apoptosis induced by the cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in WISH epithelial cells, *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 71 (2004) 191-197.
- [28] B.M. Forman, P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, R.M. Evans, 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ , *Cell* 83 (1995) 803-812.
- [29] J.U. Scher, M.H. Pillinger, 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin?, *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 114 (2005) 100-109.
- [30] M. Mochizuki, Y. Ishii, K. Itoh, T. Iizuka, Y. Morishima, T. Kimura, T. Kiwamoto, Y. Matsuno, A.E. Hegab, A. Nomura, T. Sakamoto, K. Uchida, M. Yamamoto, K. Sekizawa, Role of 15-deoxy delta(12,14) prostaglandin J2 and Nrf2 pathways in protection against acute lung injury, *American journal of respiratory and critical care medicine* 171 (2005) 1260-1266.
- [31] D.S. Straus, G. Pascual, M. Li, J.S. Welch, M. Ricote, C.H. Hsiang, L.L. Sengchanthalangsy, G. Ghosh, C.K. Glass, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000) 4844-4849.

Figure legends

Figure 1 Preventive and long-term neuroprotection by EGC during oxidative stress

A. Schematic representation of the co-culture model used to characterize the long-term preventive effects of enteric glial cells (EGC) against oxidative stress-induced neurotoxicity. SH-SY5Y cells were co-culture with EGC on transwell filters during 24h, 48h, 72h or 96h. EGC were then removed and after 3 washes with fresh medium, SH-SY5Y were treated with 200 μ M hydrogen peroxyde (H_2O_2) during 24 hours before analysis of cell death. **B.** SH-SY5Y were treated or not with H_2O_2 200 μ M for 24 hours (filled and empty bars respectively) in the presence of EGC (+ EGC) or in the presence of SH-SY5Y (+ SH-SY5Y) seeded in transwell filters as described in Figure 1B. Neuronal cell death was then analyzed by measuring the cell permeability to 7- amino-actinomycin D (7-AAD) by flow cytometry (BD FACSAArray). Values are the mean \pm SEM from 4 independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

Figure 2 15d-PGJ₂ protects SH-SY5Y cells against oxidative stress-induced neurotoxicity

SH-SY5Y were treated or not with H_2O_2 200 μ M for 24 hours (filled and empty bars respectively) after previous treatment with 15d-PGJ₂ 1 or 5 μ M during 24h(A) or 96h (B). Neuronal cell death was then analyzed by measuring the cell permeability to 7- amino-actinomycin D (7-AAD) by flow cytometry (BD FACSAArray). Values are the mean \pm SEM from 4 independent experiments (one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test).

Figure 3 15d-PGJ2 protects primary cultures of enteric nervous system (ENS) from oxidative

A-E. Primary cultures of ENS were treated (**B-E**) or not (**A**) with 200 μM H_2O_2 for 24 h with (**C-E**) or without (**A**: control; **B**: H_2O_2) a previous treatment with 1 μM (**C**), 2 μM (**D**) or 3 μM 15d-PGJ₂ and analyzed by immunostaining with anti- β -tubulin III antibodies. Pictures are representative of one of five independent experiments. Scale bar: 100 μm . **F.** Quantification of neuron specific enolase (NSE) released in the medium by enteric neurons treated or not with 200 μM H_2O_2 for 24 hours (filled and empty bars respectively) with ((+) **15d-PGJ2**) or without ((-) **15d-PGJ2**) a previous treatment with 1, 2 or 3 μM 15d-PGJ₂. Values are the mean \pm SEM of 5 independent experiments. * $p < 0.001$ compared to untreated cultures (empty bars); # $p < 0.05$ compared to primary cultures treated with H_2O_2 without 15d-PGJ₂ pretreatment; one way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Figure 4 Inhibition of PGD synthase reduced long-term preventive effects of EGC EGC

A. EGC were transfected with pLKO.1-puro shRNA anti-PTGDS gene (EGC sh PTGDS) and treated with puromycin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ until stable expression of transgene. EGC and EGC sh PTGDS were subjected to immunoblotting with an anti-PGD₂ synthase (PGDS) antibody protein followed by blotting with anti- β -actin antibody. Transfected EGC showing no difference of PGDS expression was used as a negative control (EGC shMOCK). Quantitative analysis was performed by measuring band densities with ImageJ. Values are the mean \pm SEM from 4 independent experiments. * $p < 0.05$ compared to non transfected EGC, (NS) non significant compared to non transfected EGC (t-test) **B.** SH-SY5Y were treated or not with 200 μM H_2O_2 for 24 hours (filled and empty bars respectively) in the presence of EGC (+ EGC), EGC transfected with pLKO1.0 shRNA PTGDS (+ EGCshPTGDS) or in the presence of EGC transfected with pLKO1.0 shRNA PTGDS non efficient construction (+ EGC shMOCK) seeded in transwell filters as described in Figure 1A. Neuronal cell death was then analyzed by measuring the cell permeability to 7- amino-actinomycin D (7-AAD) by flow cytometry (BD

FACSArray). Values are the mean \pm SEM from 5 independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

Figure 5 15d-PGJ2 protective effects are independent of PPAR α pathway

A. SH-SY5Y were treated or not with 200 μ M H₂O₂ for 24 hours (filled and empty bars respectively) after previous treatment with 5 μ M 15d-PGJ₂ or 5 μ M Rosiglitazone during 24h. Neuronal cell death was then analyzed by measuring the cell permeability to 7- amino-actinomycin D (7-AAD) by flow cytometry (BD FACSArray). Values are the mean \pm SEM from 6 independent experiments (* p< 0.05 compared to control conditions treated with H₂O₂. (NS) non significant compared to H₂O₂ treated cells to control conditions treated with H₂O₂ (one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test) **B.** SH-SY5Y were treated or not with 200 μ M H₂O₂ for 24 hours (filled and empty bars respectively) after 24h treatment with 5 μ M 15d-PGJ₂ preceded or not by 24h pre-treatment with 10 μ M GW9662. Neuronal cell death was then analyzed by measuring the cell permeability to 7- amino-actinomycin D (7-AAD) by flow cytometry (BD FACSArray). Values are the mean \pm SEM from 4 independent experiments. *p< 0.05 compared to control conditions (vehicle) treated with H₂O₂. NS non significant compared to H₂O₂ treated cells with 15d-PGJ₂ previous treatment (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

Figures

Figure 1

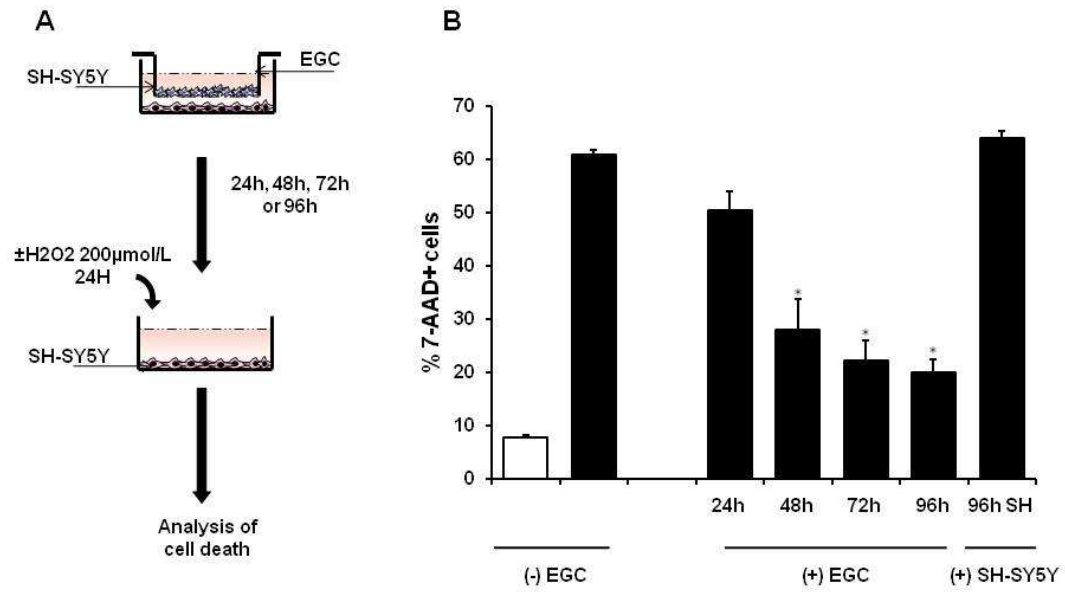


Figure 2

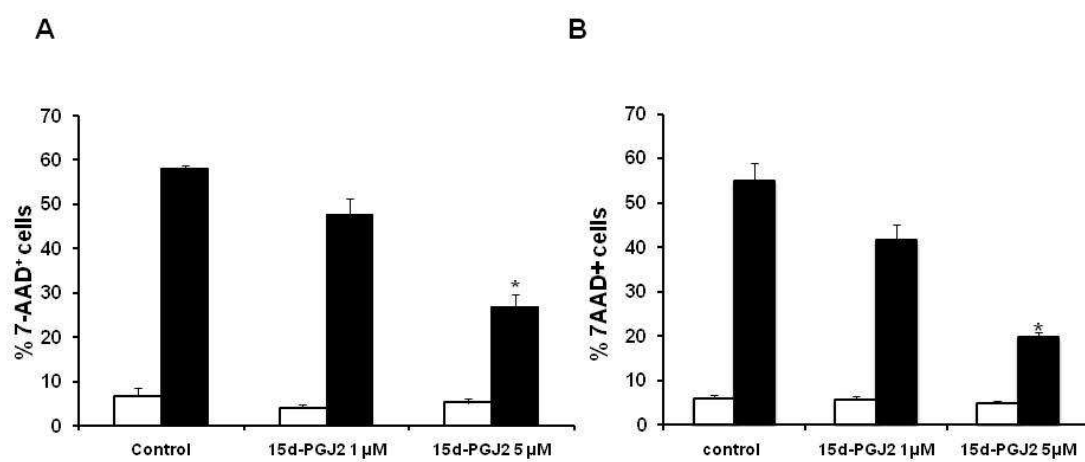


Figure 3

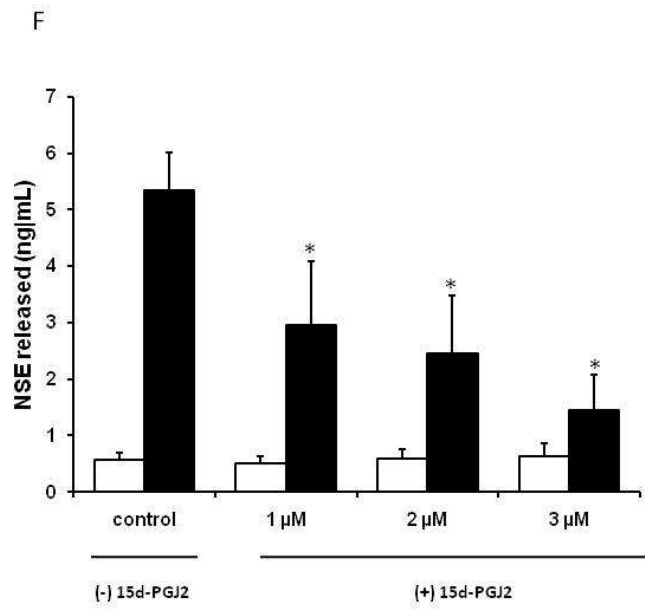
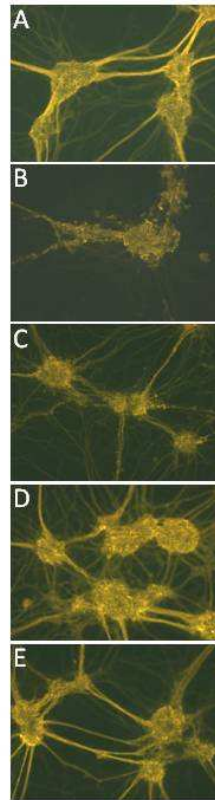
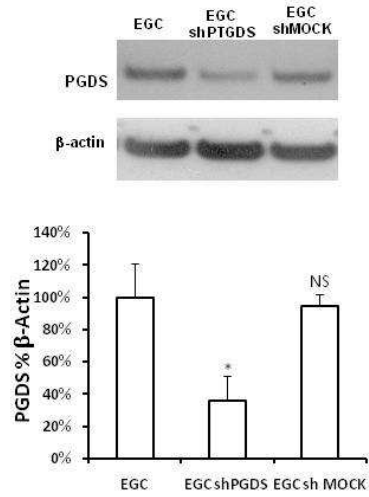


Figure 4

A



B

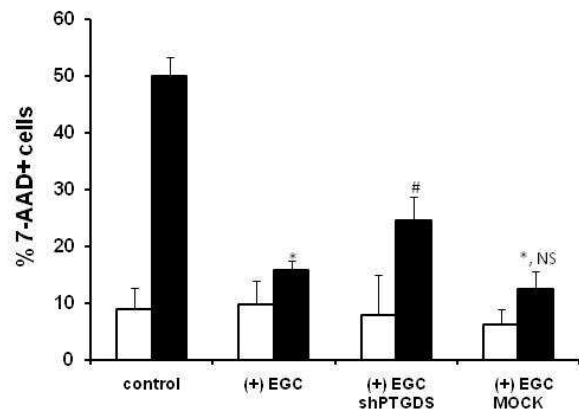
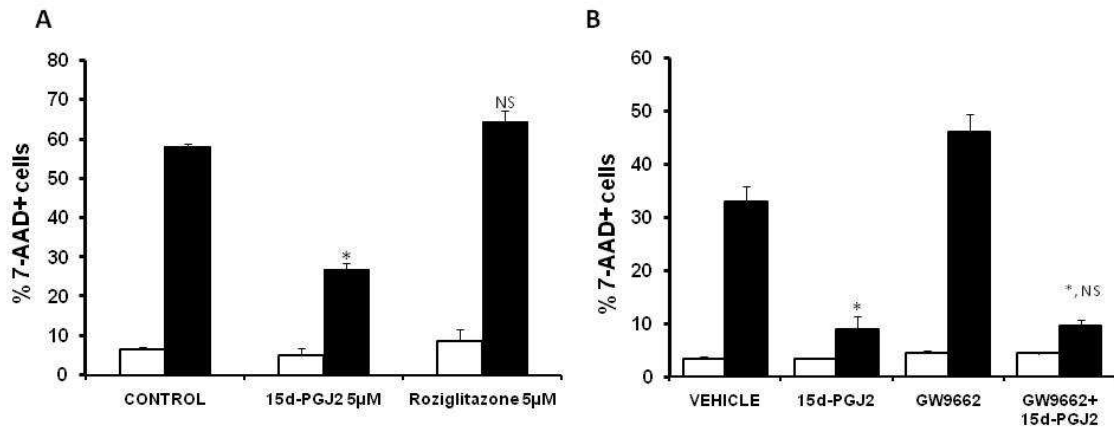


Figure 5



Article 3 : Rôle des cellules épithéliales intestinales dans le contrôle des fonctions du SNE : régulation du phénotype neurochimique et rôle neuroprotecteur contre un stress oxydant

Le système nerveux entérique (SNE) constitue un réseau neuronal localisé tout le long du tube digestif contrôlant les différentes fonctions gastro-intestinales. Des travaux récents ont montré que les neurones entériques jouaient un rôle dans le contrôle de la barrière épithéliale intestinale (BEI), en agissant sur la sécrétion d'électrolytes, la prolifération des cellules épithéliales intestinales et la résistance trans-épithéliale (Neunlist et al. 2008). Il semblerait que cette modulation soit réciproque. En effet plusieurs études ont montré que les cellules épithéliales intestinales (CEI) jouent un rôle important dans le contrôle des différentes fonctions du SNE. Cependant le rôle des CEI dans le contrôle du phénotype neurochimique et dans le contrôle de la survie neuronale est très peu connu. Nous avons donc voulu étudier l'impact des CEI sur l'expression de neuromédiateurs au niveau du SNE et leur rôle neuroprotecteur lors d'un stress oxydant.

L'étude des interactions neuro-épithéliales a été réalisée en utilisant un modèle de co-culture de lignées de CEI avec des cultures primaires de SNE ou la lignée de neuroblastome SH-SY5Y. Les lignées épithéliales Caco-2, T84 et IEC-6 ont été cultivées sur filtre pendant 13 jours, jusqu'à l'obtention d'un phénotype différencié. Les cultures primaires de SNE ont été préparées à partir d'intestins d'embryons de rat et cultivées pendant 13 jours pour obtenir un réseau neuronal différencié (voir l'article 1).

Afin d'étudier l'effet des CEI sur le phénotype neurochimique, les cultures primaires de SNE ont été co-cultivées avec les cellules Caco-2 pendant 3 jours. La proportion des différentes populations neuronales par rapport à un marqueur

neuronal général (anti-Hu) a été déterminée par immunocytochimie. Nous avons montré que la co-culture avec des CEI induisait une augmentation de la proportion population VIPergique sans modification de la population nitreergique. Ces effets étaient reproduits en utilisant deux autres types de lignées épithéliales : la lignée T84 et la lignée IEC-6. L'analyse des ARN messagers par PCR quantitative confirme au niveau transcriptionnel l'augmentation de l'expression des ARNm du VIP en présence de chacune des trois lignées.

Afin d'étudier les effets neuroprotecteurs des CEI, nous avons co-cultivé les cellules Caco-2 avec les cultures primaires ou avec la lignée de neuroblastome SH-SY5Y. Après 24 heures de co-culture, les cellules étaient traitées avec 1.2 mM de dopamine afin d'induire un stress oxydant. Suite à 24 heures de traitement par la dopamine, la mort neuronale était analysée par la mesure de la libération de NSE (Neuronal specific enolase) dans le milieu des cultures primaires de SNE. La NSE est une protéine cytoplasmique spécifique des neurones, dont la libération dans le milieu reflète spécifiquement la mort neuronale. La mort neuronale était également évaluée par l'analyse de l'activation de la caspase-3, enzyme clef de la mort apoptotique, ou par mesure de la perméabilité membranaire au 7-AAD par cytométrie de flux. Nous avons montré que la libération de NSE induite par le stress oxydant était significativement réduite en présence de cellules caco-2 en co-culture. Ces données démontrent les effets neuroprotecteurs des CEI dans un modèle pluricellulaire de cultures primaires de SNE. De façon similaire, l'induction de la perméabilité membranaire des cellules SH-SY5Y induite par le traitement à la dopamine était significativement réduite en présence de CEI. Ceci confirme le rôle neuroprotecteur direct des CEI dans un modèle simplifié de co-culture entre une lignée de cellules épithéliales et une lignée de neuroblastome.

Nous avons ensuite montré que les effets protecteurs des CEI étaient préservés en l'absence de celles-ci lors de l'application du stress oxydant induit par la dopamine. Lorsque les filtres contenant les cellules Caco-2 étaient retirés après 24h ou 48h de co-culture, l'effet protecteur sur les cellules SH-SY5Y était préservé, cet effet était maintenu après deux lavages avec du milieu frais.

Le NGF (Nerve growth factor) pourrait être responsable des effets des CEI. Confirmant des résultats antérieurs (Varilek et al. 1995; Ma et al. 2003), nous avons montré que les CEI produisaient du NGF. Les récepteurs à haute affinité (TrkA) et à faible affinité (p75) du NGF étaient exprimés par les cultures primaires de SNE. Le traitement de ces cultures avec du NGF provoquait une augmentation significative de la proportion de neurones VIPergiques sans modifier l'expression de la nNOS. Enfin le NGF protégeait les neurones entériques contre les effets toxiques de la dopamine. Un prétraitement au NGF des cultures primaires permettait une réduction significative de la proportion de neurones exprimant la caspase-3 active, indice précoce de mort apoptotique.

Cette dernière étude démontre le rôle neuroprotecteur des CEI lors d'un stress oxydant induit par la dopamine. Ces effets sont potentiellement médiés par le NGF qui reproduit les effets des CEI en modulant le phénotype neurochimique et en protégeant les neurones contre un stress oxydant. Cependant, l'implication directe du NGF reste à démontrer.



Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: Role of epithelial cells

Raphaël Moriez^{a,b,c}, Hind Abdo^{a,b,c}, Tanguy Chaumette^{a,b,c}, Magali Faure^d, Bernard Lardeux^{a,b,c}, Michel Neunlist^{a,b,c,*}

^aINSERM, U913, 1, Place Alexis Ricordeau – 3HNB, Nantes F-44093, France

^bUniversité de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44093, France

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

^dNestlé Research Center, CH-100 Lausanne 26, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2009

Available online 18 March 2009

Keywords:

Intestinal epithelial cells

Enteric nervous system

Neurochemical coding

Neuroprotection

Nerve growth factor

ABSTRACT

Neurons of enteric nervous system (ENS) regulate intestinal epithelial cells (IEC) functions but whether IEC can impact upon the neurochemical coding and survival of enteric neurons remain unknown. Neuro-epithelial interactions were studied using a coculture model composed of IEC lines and primary culture of rat ENS or human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). Neurochemical coding of enteric neurons was analysed by immunohistochemistry and quantitative PCR. Neuroprotective effects of IEC were tested by measuring neuron specific enolase (NSE) release or cell permeability to 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Following coculture with IEC, the percentage of VIP-immunoreactive (IR) neurons but not NOS-IR and VIP mRNA expression were significantly increased. IEC significantly reduced dopamine-induced NSE release and 7-AAD permeability in culture of ENS and SH-SY5Y, respectively. Finally, we showed that NGF had neuroprotective effects but reduced VIP expression in enteric neurons. In conclusion, our study identified a novel role for IEC in the regulation of enteric neuronal properties.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The enteric nervous system (ENS) is an integrative neuronal network organized along the gut which regulates gastrointestinal functions. Part of this regulation occurs via the liberation of mediators to the different target cells innervated by the enteric neurons such as intestinal epithelial cells (IEC). In particular, recent studies have shown that enteric neurons control intestinal epithelial barrier (IEB) function such as electrolyte secretion, barrier resistance and intestinal cells proliferation [1]. Conversely, enteric neurons are also under the control of its cellular microenvironment and in this context the IEB plays a crucial role. In particular, it is now well admitted that the IEB, and in particular enterochromaffin cells are able to transduce luminal signal to the enteric neurons via their secretion of serotonin and to activate enteric reflexes controlling intestinal peristalsis or mucosal secretion [2,3]. Also, mucosal application of short chain fatty acids or acidity induced the activation of myenteric neurons which depends on the presence of the mucosa [4]. Mechanical deformation of the mucosa is also able to activate myenteric neurons [5]. Further, supporting this regulation of neuronal excitability by the mucosa is the observation that

ex vivo mucosal removal leads to a reduced neuronal excitability [6]. Besides these short term effects, emerging evidence suggest that the IEB can also impact over long term upon neuronal functions. It has been shown that erbB2 signalling in the colonic epithelia is required for the postnatal survival of enteric neurons [7]. In addition, Caco-2 IEC lines have been shown to favour neurite outgrowth in PC12 cells [8]. However, whether IEC can exert neuroprotective effects is currently unknown. In addition, a recent study has shown that IEC can impact on the ENS by regulating neuronal synthesis of chemokines. In particular, under basal condition, IEC reduced neuronal mRNA expression of IL-8 and MIP-1 β in neuronal cell lines [9]. Following stimulation of the IEC by TNF- α /IFN- γ , IEC directly increased neuronal production or mRNA expression of cytokines [9]. However, besides regulation of neuronal production of chemokines, it remains currently unknown whether IEC can also regulate the neuronal expression of neuromediators. Therefore, using coculture of IEC lines and primary culture of rat ENS or neuroblastoma cell lines, we aimed at characterizing whether IEC can modulate neuromediators expression and exert neuroprotective effects.

Materials and methods

Cell culture. Primary cultures of rat ENS were obtained as previously described [10]. Human neuronal-like SH-SY5Y cells were cultured as previously described [11]. Caco-2, T84, IEC-6 (ATCC

Abbreviations: ENS, enteric nervous system; IEB, intestinal epithelial barrier; IEC, intestinal epithelial cell; NGF, nerve growth factor; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NSE, neuron specific enolase; VIP, vasoactive intestinal peptide.

* Corresponding author. Address: INSERM, U913, 1, Place Alexis Ricordeau – 3HNB, Nantes F-44093, France. Fax: +33 2 40 08 75 06.

E-mail address: michel.neunlist@univ-nantes.fr (M. Neunlist).

were seeded in 12-well Transwell® filters (Corning, NY, USA) at a density of 2×10^5 cells/insert and cultured for 13 days to obtain

Table 1
List of primary antibodies.

Raised against	Host species	Source or reference	Dilution
Hu proteins (HuC/D)	Mouse	Molecular Probes, OR, USA	1:200
VIP	Mouse	US biological, MA, USA	1:800
nNOS	Rabbit	Alexis Biochemicals, CA, USA	1:2000
P75	Rabbit	MC192 (gift from Dr. E.G. Johnson) [13]	1:3500
trkA	Rabbit	Kindly provided by Dr. L. Reichard [14]	1:5000
Active caspase-3	Rabbit	Sigma, Saint-Quentin Fallavier, FR	1:500

Table 2
List of secondary antibodies.

Antibody	Source or reference	Dilution
FluoroProbes488 donkey anti-mouse	Interchim, Montluçon, FR	1:200
Cy3-conjugated donkey anti-mouse	Jackson ImmunoResearch, BA, USA	1:500
Cy5-conjugated goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch, BA, USA	1:500
Cy3-conjugated donkey anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch, BA, USA	1:500

confluence as previously described [12]. All cells were maintained in 95% air, 5% CO₂ at 37 °C.

Neuro-epithelial coculture model. Forty-eight hours prior to coculture with primary ENS or SH-SY5Y, IEC media were replaced by primary ENS or SH-SY5Y media, respectively. Coculture were performed by maintaining primary ENS or SH-SY5Y cells in presence or absence of IEC for 3 days (neurochemical coding experiments) or 1 day (neuroprotection experiments).

Oxidative stress. Oxidative stress was induced during 24 h with dopamine. Preliminary experiments show that neurotoxic effect in SH-SY5Y cells reaching a maximum at a concentration of dopamine of 1.2 mM (data not shown). This dose was chosen for the rest of the study.

Immunohistochemical analysis. At the end of the experiments, primary culture ENS was processed for immunohistochemical studies as previously described [10]. Primary culture of ENS was incubated in primary antibodies (Table 1) for 90 min. Following 3×10 min washes with PBS, they were incubated for 30 min with secondary antibodies (Table 2). In a second step, all neurons were stained with antibodies against the neuronal marker HuC/D. The number of VIP-, nNOS-, active caspase-3- and Hu-IR cells was counted in at least 20 ganglia per condition. The data were expressed as a percentage normalized to the total Hu-IR neurons.

Quantitative PCR analysis. Total RNA isolation and PCR were performed based on previously described methods [10]. The following primers were used: S6 forward: 5'-CCA AGC TTA TTC AGC GTC TTG TTA ACT CC-3', S6 reverse: 5'-CCC TCG AGT CCT TCA TTC TC TTG

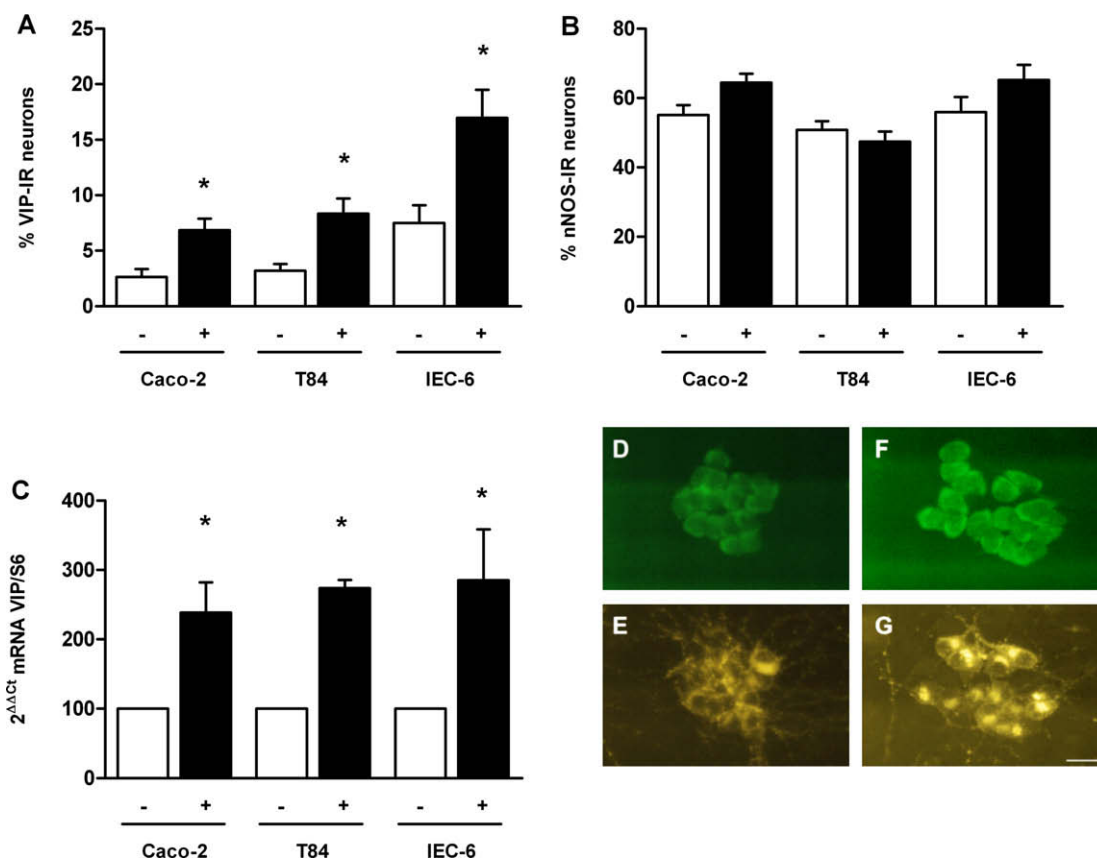


Fig. 1. Intestinal epithelial cells (IEC) modulate the neurochemical coding of the ENS. Primary cultures of ENS were cultured with or without IEC (Caco-2, T84 or IEC-6 cells) for 72 h. Culturing IEC with ENS induced a significant increase in the proportion of VIP-immunoreactive (IR) (A) but not nNOS-IR neurons (B) ($n = 6$, paired t test, $^*p < 0.05$ compared to control). VIP mRNA levels in ENS cultured with IEC were significantly larger than in primary ENS alone (C) ($n = 6$, paired t test, $^*p < 0.05$ compared to control). Values represent means \pm SEM. Double immunohistochemical labelling of primary ENS cocultured with or without IEC. Images showed that a larger number of neurons (identified with Hu) were VIP-IR in presence of IEC (F,G, respectively) as compared to control (D,E, respectively). Scale bar = 20 μ m.

GC-3', VIP forward: 5'-TTG GCA AAC GAA TCA GCA GTA G-3', VIP reverse: 5'-ATT TGC TTT CTA AGG CGG GTG TA-3'. VIP mRNA expression was quantified using the 2- $^{-\Delta\Delta}$ CT method [13] with S6 as the internal control. Data are representative of six experiments performed in duplicate.

Assessment of cell viability. At the end of experiment, SH-SY5Y cells were collected both in the supernatant and on the bottom of the wells following treatment with trypsin-EDTA. Membrane permeability was evaluated by flow cytometry (BD FACSarray (Le pont de Claix, France) following incubation of cell suspension with 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Results were expressed as percentage of total cells.

Detection of NSE. Neuron specific enolase (NSE) released in the culture medium was quantified by immunoradiometric assay (Prolifigen[®] NSE IRMA, Diasorin; Stillwater, USA). Results are expressed in ng/mL.

Chemicals. NGF (100 ng/ml; Sigma) was added in the culture medium for 72 or 24 h.

Statistical analysis. Analyses were done with GraphPad Prism 4.0c (GraphPad, San Diego, CA, USA). All data were expressed as means \pm SEM. Conditions were compared using a one-way analysis of variance for repeated measures for multiple comparisons, or using a paired Student's *t* test. Difference were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Intestinal epithelial cells modulate the neurochemical phenotype of the ENS

Coculturing Caco-2 with primary ENS induced a significant +161% increase in the proportion of VIP-IR neurons as compared to control (i.e., ENS cultured alone; Fig. 1A, $n = 6$, $p < 0.05$). In contrast, the proportion of nNOS-IR neurons was not affected by the coculture (Fig. 1B). Furthermore, coculture of ENS with Caco-2 did not modify neuronal viability as (1) the number of neurons per ganglia was identical in both conditions (19.6 ± 0.7 vs. 19.5 ± 0.5 Hu-IR neurons/ganglia, $n = 6$) and (2) NSE levels in the culture supernatant was not modified by the culture with IEC compared to control (1.0 ± 0.2 vs. 0.6 ± 0.1 ng/mL, respectively; Fig. 2A, $n = 5$).

To determine whether other IEC lines can modify the phenotype of the ENS, we characterized the effect of ENS coculture with other transformed (T84) and non-transformed (IEC-6) IEC. Under these conditions, both IEC lines reproduced the effects of Caco-2 onto the proportion of VIP- and NOS-IR neurons (Fig. 1A and B). We next sought to determine whether the increase in the proportion of VIP-IR neurons was associated with an increase in VIP mRNA expression. Indeed, coculture of ENS with all IEC lines used induced a significant increase in VIP mRNA expression (Fig. 1C, $p < 0.05$).

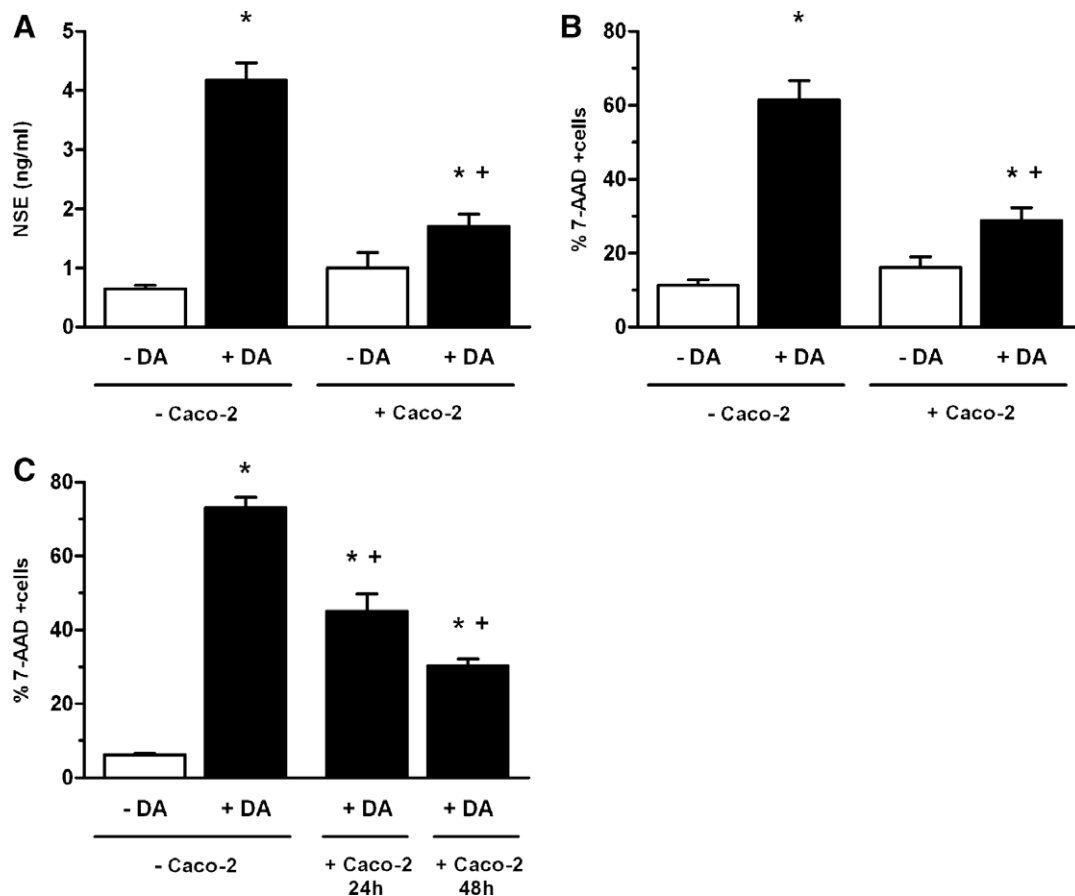


Fig. 2. Intestinal epithelial cells (IEC) prevent neuronal cell death induced by dopamine in primary cultures of ENS and in neuroblastoma cell lines. Treatment of primary culture of ENS with dopamine (1.2 mM) for 24 h induced a significant increase in extracellular level of NSE as compared to control (without dopamine). In presence of Caco-2, dopamine-induced NSE release was significantly reduced as compared to ENS alone treated with dopamine (A) ($n = 5$; $p < 0.001$ compared to control; $*p < 0.05$ compared to ENS treated with dopamine alone; one-way ANOVA). Treatment of SH-SY5Y cells with dopamine (1.2 mM) for 24 h induced a significant increase in 7-amino-actinomycin D (7-AAD) permeability as compared to control (without dopamine). In presence of Caco-2, dopamine-induced 7-AAD permeability was significantly reduced as compared to SH-SY5Y cultured alone and treated with dopamine (B) ($n = 7$; $p < 0.001$ compared to control; $*p < 0.05$ compared to SH-SY5Y cells treated with dopamine alone; one-way ANOVA). Culturing SH-SY5Y with Caco-2 prior to dopamine treatment (but not during oxidative stress) was sufficient to significantly reduce dopamine-induced increase in cell permeability as compared to SH-SY5Y cultured alone and treated with dopamine. Increasing the duration of coculture prior to oxidative stress increased the protective effect of IEB. ($n = 4$, $*p < 0.001$ compared to control, $*p < 0.05$ compared to SH-SY5Y cells treated with dopamine alone; one-way ANOVA). Values represent means \pm SEM.

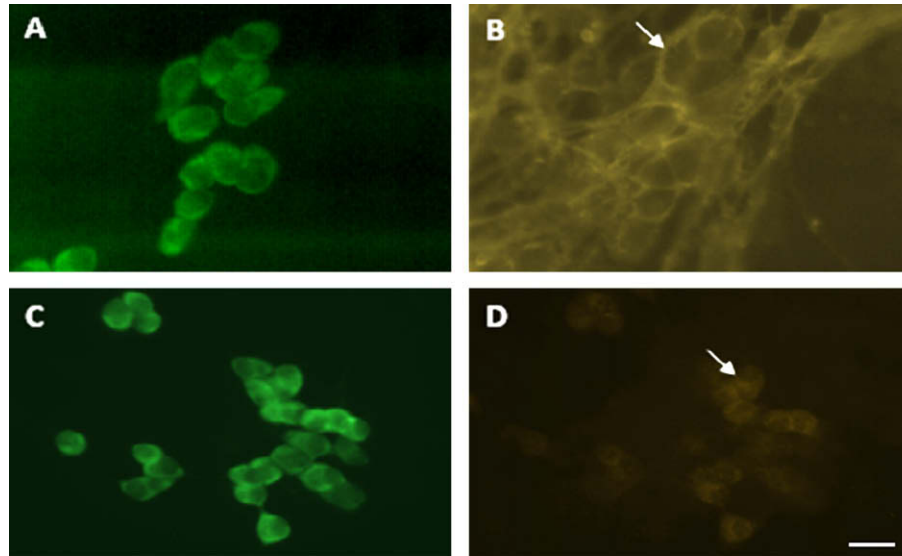


Fig. 3. Primary cultures of ENS express the receptors of NGF P75 end trkA. Double immunofluorescence staining of primary cultures of ENS with anti-Hu, anti-p75 or anti-trkA antibodies. Double immunohistochemical staining revealed enteric neurons (identified with Hu; A) with p75-immunoreactivity which was found solely on the plasma membrane of neurons (arrow, B). In addition, double immunohistochemical staining revealed enteric neurons (identified with Hu; C) with cytoplasmic trkA-immunoreactivity (arrow, D). Scale bar = 20 μ m.

Intestinal epithelial cells protect enteric neurons during oxidative stress

Addition of dopamine to primary ENS induced a significant release of NSE in the culture medium as compared to control (4.2 ± 0.3 vs. 0.6 ± 0.1 ng/mL, respectively; Fig. 2A, $n = 5$, $p < 0.001$). In contrast, coculture with Caco-2 for 24 h prior the oxidative stress prevented the effects of dopamine upon the release of NSE (1.7 ± 0.2 vs. 4.2 ± 0.3 ng/mL, respectively; Fig. 2A, $n = 5$, $p < 0.001$). The direct neuroprotective effect of IEC was then evaluated using the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Dopamine induced a significant increase in cell permeability in SH-SY5Y compared to SH-SY5Y alone (control) ($61.4 \pm 5.2\%$ vs. $11.4 \pm 1.4\%$ 7-AAD positive cells/total cells, respectively; Fig. 2B, $n = 7$, $p < 0.001$). This dopamine-induced increase in cell permeability was prevented when SH-SY5Y were cocultured with Caco-2 monolayer for 24 h prior oxidative stress as compared to control ($28.9 \pm 3.5\%$ vs. $61.4 \pm 5.2\%$ 7-AAD positive cells/total cells, respectively; Fig. 2B, $n = 7$, $p < 0.001$). Such neuroprotective effects of Caco-2 did not require their presence during oxidative stress. Indeed, we still observed a neuroprotective effect of IEC upon SH-SY5Y if Caco-2 were cocultured with SH-SY5Y only 24 h prior the addition of dopamine but were not present during oxidative stress as compared to control ($45.0 \pm 4.8\%$ vs. $73.0 \pm 2.8\%$ of 7-AAD positive cells/total cells, respectively; Fig. 2C, $n = 4$, $p < 0.001$). These preventive neuroprotective effects of Caco-2 were more effective if IEC were cocultured with SH-SY5Y for 48 h prior oxidative stress compared to 24 h time ($30.3 \pm 1.8\%$ vs. $45.0 \pm 4.8\%$ of 7-AAD positive cells/total cells, respectively; Fig. 2C, $n = 4$, $p < 0.05$).

The effects of IEC upon neuronal functions are mediated in part by NGF

We finally sought to identify putative mediators secreted by IEC involved in their effects upon the ENS. We tested the effects of NGF which has been previously shown to be secreted by IEC [14,15]. We first confirmed that IEC also synthesize NGF in our conditions (data not shown). We next showed that both low-affinity receptor p75 and high-affinity trkA receptor for NGF were expressed in enteric neurons of primary ENS (Fig. 3). Concerning the role of this neurotrophin in the regulation of neurochemical coding, addition of NGF to primary ENS reduced significantly the proportion of VIP-IR

neurons compared to control (-66% , Fig. 4A, $n = 6$, $p < 0.01$) without modifying the one of nNOS (Fig. 4A; $n = 6$). The number of neurons per ganglion was not modified by the addition of NGF (data

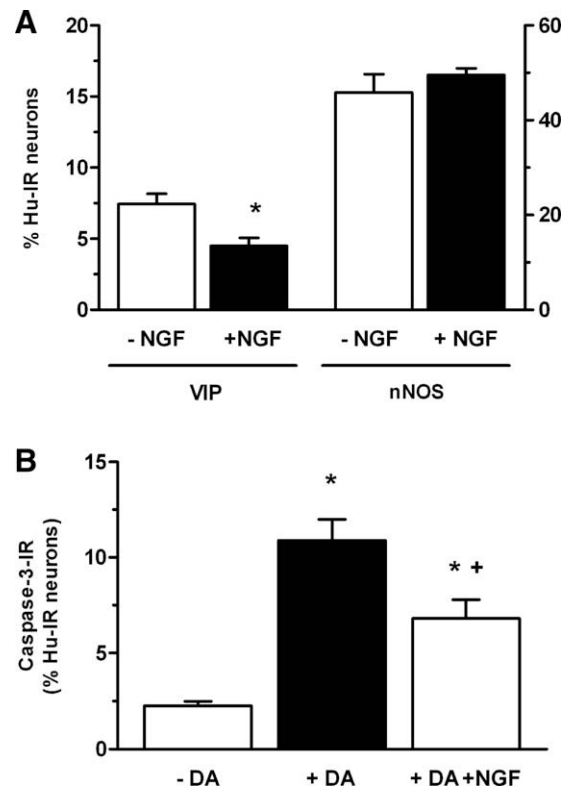


Fig. 4. Intestinal epithelial cells (IEC) effects upon the ENS are mediated in part by NGF. Primary cultures of ENS were treated or not with NGF 100 ng/ml for 72 h. The percentage of VIP-immunoreactive (IR) but not NOS-IR in the ENS was significantly decreased by NGF. (A) ($n = 6$; $p < 0.05$ compared to control; one-way ANOVA). ENS was treated with or without dopamine in absence or in presence of NGF. The proportion of caspase-3-IR neurons induced by dopamine was significantly reduced in presence of NGF as compared to ENS alone treated with dopamine. (B) ($n = 5$, $p < 0.001$ compared to control; $*p < 0.05$ compared to primary ENS treated with dopamine alone; one-way ANOVA). Values represent means \pm SEM.

not shown). Concerning its neuroprotective role, we showed that preincubation of NGF with primary ENS significantly reduced the dopamine-induced neurotoxicity (–60% of caspase-3 positive neurons; Fig. 4C, $n = 5$, $p < 0.05$).

Discussion

This study identified a novel role of IEC in the control of neuronal functions. In particular, we showed that IEC can modulate neurochemical phenotype and exhibit neuroprotective effects. We also identified NGF as being as one of the mediators involved in the control of ENS properties by the IEB.

Emerging evidences suggest that the IEB can regulate the properties of enteric neurons and in particular its excitability, in response to luminal and mechanical stimulation of the mucosa. This regulation occurs over short period of time, *i.e.*, milliseconds to seconds. However, much less is known about the long-term regulation of ENS properties by the IEB. Our coculture model based on the use of primary culture of ENS allows extensive physiological studies of the role of the IEB upon various ENS properties. Although being based on the use of primary culture of rat ENS, we showed that rat IEC lines could reproduce the effects of human IEC lines in this model.

Using this coculture model, we first demonstrated that the IEB specifically modified the neurochemical coding of enteric neurons, by increasing the proportion of VIP-IR neurons and VIP mRNA expression without modifying nNOS-IR. This effect was not associated with an increased cell proliferation as the total number of neurons per ganglia remained unchanged in presence of IEC as compared to control. The exact mechanisms involved in this cross-talk between IEC and enteric neurons have not been identified in this work. Previous studies have shown that neuronal activity increased the proportion of VIP-IR neurons in our primary ENS culture model [10]. Whether such induction is regulated by neuronal activity is unknown, although removal of mucosa has been shown to reduce neuronal activity in the ENS [6]. Such impact of IEC upon the neurochemical coding of the ENS has never been reported and its signification remains to be determined. However, it is tempting to speculate that such interactions could be in part responsible for the increased proportion of VIP-IR neurons observed in the submucosal plexus (which are in close proximity to IEB) as compared to the one in the myenteric plexus (which are more distant from the IEB). [16,17] Although our study did not identify the function of these VIPergic neurons, previous study showed that submucosal VIPergic neurons regulate several functions of the intestinal epithelial barrier, such as electrolytes and mucus secretion, permeability and proliferation [1]. Besides regulating the neurochemical coding, our study also revealed that IEB could have neuroprotective effects upon the enteric neurons. To our knowledge this is the first report of neuroprotective functions directly attributed to IEC. A previous study has already hinted to such a role for IEC by demonstrating that erbB2 (receptor of neuregulins) signalling in colonic epithelial cells was necessary for ENS postnatal survival [7]. In this study, we extend this observation by demonstrating that IEC via the liberation of soluble factor have direct neuroprotective effects. Neuroprotective effects of IEC are probably due in part to the induction in neurons of an increased resistance to oxidative stress, as preincubation alone of ENS with IEC-conditioned medium prior to oxidative stress was sufficient to induce neuroprotection. Although currently unknown, the neuroprotective mechanisms of IEC could be due to the regulation of survival/death factors (Bcl-2; Bcl-xl; Bax. . .) or neuroprotective substances (glutathion, . . .) in enteric neurons.

Finally, a major result obtained in this study is that we identified NGF as being a likely mediator involved in the effects of IEC

upon ENS properties. We first showed that NGF is expressed by IEC as previously reported by other studies [14,15]. We then showed that NGF receptors (p75 and trkA) were present in the neurons of primary ENS culture. These results are consistent with data showing a wide distribution and often coexpression of trkA and p75 receptors in myenteric neurons [18]. However, in their studies the functional consequence of the activation of these receptors remained unknown. In view of our study we can hypothesize that NGF secretion by IEC under physiological condition (as in our model) could have neuroprotective effects, via the activation of high-affinity trkA receptor. However, under pathological conditions, such as inflammatory bowel disease, large amounts of NGF released by IEC [19] could activate p75 receptors and induce enteric neuronal cell death [20]. Besides regulating cell survival, our study also suggests that NGF regulates the neurochemical phenotype of enteric neurons. Indeed, we showed that NGF reduced the proportion of VIP-IR enteric neurons. This observation is in agreement with data showing an increase in VIP-IR in the myenteric plexus of ileum from rats treated with NGF antiserum compared with controls [21]. Similarly, in rats injected with an antiserum against NGF, increased levels of VIP protein and mRNA expression have been observed in sensory neurons in lumbar dorsal root ganglia [22]. It remains currently unknown which mediator is responsible for the increase in the proportion of VIP-IR neurons. The regulation by NGF of increased neuronal survival and reduced VIP expression can also be viewed from an integrated view to limit functional redundancy. Indeed, as VIP has neuroprotective effect in the ENS [23,24] downregulation of its expression would by NGF which has the same properties have no impact on the survival of the neurons under physiological conditions.

In conclusion, this study extends the role of IEB in the control of neuronal functions (neurochemical content, survival) and also suggests that alterations in IEB phenotype, such as those observed during infectious or inflammatory insults, could impact upon ENS phenotype. This study also suggests that targeting the IEB could be of interest in the prevention/treatment of enteric neuropathies.

Acknowledgments

The authors thank Philippe Aubert and Julien Chevalier for excellent technical support.

References

- [1] M. Neunlist, L. Van Landeghem, A. Bourreille, T. Savidge, Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease, *J. Intern. Med.* 263 (2008) 577–583.
- [2] A.L. Kirchgessner, M.T. Liu, M.D. Gershon, In situ identification and visualization of neurons that mediate enteric and enteropancreatic reflexes, *J. Comp. Neurol.* 371 (1996) 270–286.
- [3] H.J. Cooke, M. Sidhu, Y.Z. Wang, 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon, *Neurogastroenterol. Motil.* 9 (1997) 181–186.
- [4] P.P. Bertrand, W.A. Kunze, J.C. Bornstein, J.B. Furness, M.L. Smith, Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) G422–G435.
- [5] J.C. Bornstein, J.B. Furness, T.K. Smith, D.C. Trussell, Synaptic responses evoked by mechanical stimulation of the mucosa in morphologically characterized myenteric neurons of the guinea-pig ileum, *J. Neurosci.* 11 (1991) 505–518.
- [6] W.A. Kunze, P.P. Bertrand, J.B. Furness, J.C. Bornstein, Influence of the mucosa on the excitability of myenteric neurons, *Neuroscience* 76 (1997) 619–634.
- [7] S.A. Crone, A. Negro, A. Trumpp, M. Giovannini, K.F. Lee, Colonic epithelial expression of ErbB2 is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system, *Neuron* 37 (2003) 29–40.
- [8] H. Satsu, T. Yokoyama, N. Ogawa, Y. Fujiwara-Hatano, M. Shimizu, The changes in the neuronal PC12 and the intestinal epithelial Caco-2 cells during the coculture. The functional analysis using an in vitro coculture system, *Cytotechnology* 35 (2001) 73–79.
- [9] E. Tixier, J.P. Galmiche, M. Neunlist, Intestinal neuro-epithelial interactions modulate neuronal chemokines production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 (2006) 554–561.

- [10] J. Chevalier, P. Derkinderen, P. Gomes, R. Thinard, P. Naveilhan, P. Vanden Berghe, M. Neunlist, Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system, *J. Physiol.* 586 (2008) 1963–1975.
- [11] E. Tixier, F. Lalanne, I. Just, J.P. Galmiche, M. Neunlist, Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion, *Cell. Microbiol.* 7 (2005) 1798–1810.
- [12] M. Neunlist, P. Aubert, S. Bonnaud, L. Van Landeghem, E. Coron, T. Wedel, P. Naveilhan, A. Ruhl, B. Lardeux, T. Savidge, F. Paris, J.P. Galmiche, Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (2007) G231–G241.
- [13] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [14] D. Ma, D. Wolvers, A.M. Stanisz, J. Bienenstock, Interleukin-10 and nerve growth factor have reciprocal upregulatory effects on intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284 (2003) R1323–R1329.
- [15] G.W. Varilek, G.A. Neil, W.P. Bishop, J. Lin, N.J. Pantazis, Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) G445–G452.
- [16] Z.D. Qu, M. Thacker, P. Castelucci, M. Bagyanszki, M.L. Epstein, J.B. Furness, Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine, *Cell Tissue Res.* 334 (2008) 147–161.
- [17] M. Costa, S.J. Brookes, P.A. Steele, I. Gibbins, E. Burcher, C.J. Kandiah, Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum, *Neuroscience* 75 (1996) 949–967.
- [18] A. Lin, S. Lourenssen, R.D. Stanzel, M.G. Blennerhassett, Nerve growth factor sensitivity is broadly distributed among myenteric neurons of the rat colon, *J. Comp. Neurol.* 490 (2005) 194–206.
- [19] R.D. Stanzel, S. Lourenssen, M.G. Blennerhassett, Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon, *Exp. Neurol.* 211 (2008) 203–213.
- [20] A. Lin, S. Lourenssen, R.D. Stanzel, M.G. Blennerhassett, Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis, *Exp. Neurol.* 191 (2005) 337–343.
- [21] A. Belai, J. Aberdeen, G. Burnstock, Differential effect of immunosympathectomy on the expression of rat enteric neurotransmitters, *Neurosci. Lett.* 139 (1992) 157–160.
- [22] A.M. Shadiack, Y. Sun, R.E. Zigmond, Nerve growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact sympathetic and sensory neurons, *J. Neurosci.* 21 (2001) 363–371.
- [23] K. Sandgren, Z. Lin, A.F. Svenningsen, E. Ekblad, Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture, *J. Neurosci. Res.* 72 (2003) 595–602.
- [24] M.B. Arciszewski, E. Sand, E. Ekblad, Vasoactive intestinal peptide rescues cultured rat myenteric neurons from lipopolysaccharide induced cell death, *Regul. Pept.* 146 (2008) 218–223.

Discussion générale

Les travaux menés au cours de cette thèse permettent de mieux appréhender les relations neuro-gliales dans le SNE et plus spécifiquement le contrôle de la survie neuronale par les CGE. L'ensemble de ces données permet de mettre en évidence la CGE comme un acteur de première ligne dans la neuroprotection et d'envisager leur rôle dans le concept émergent de neuropathie entérique.

1 Les cellules gliales entériques : un acteur de première ligne dans le contrôle des fonctions neuronales

L'objectif principal de nos travaux était de caractériser le contrôle de la survie des neurones entériques par les CGE et les bases cellulaires et moléculaires impliquées dans ce contrôle. Le rôle neuroprotecteur des CGE a déjà été suggéré dans un modèle de souris transgéniques dépourvues de CGE (Bush et al. 1998). Ces souris présentaient une dégénérescence des neurones entériques associée à l'ablation gliale induite. Toutefois, l'inflammation intestinale sévère présentée de façon concomitante ne permettait pas de déterminer si la dégénérescence neuronale observée résultait de la perte gliale ou si elle était la conséquence directe de l'état inflammatoire.

Au cours de notre travail, l'étude des interactions neuro-gliales directes a été réalisée en utilisant un modèle de culture primaire de SNE. Ce modèle pluricellulaire est composé d'un réseau neuronal différencié en ganglions associé aux CGE et aux cellules musculaires lisses. Ce modèle de cultures primaires reproduit la composition et les propriétés neurochimiques du SNE *in vivo*, mais est

dépourvu de cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires (Chevalier et al. 2008). Ces deux critères font de ces cultures un modèle de choix pour étudier les interactions neuro-gliales sans influence des autres composantes qui peuvent intervenir *in vivo*. L'utilisation d'une stratégie d'infection adénovirale a permis de mettre en évidence un ciblage préférentiel et spécifique des CGE par les particules adénovirales. Cette ablation des CGE provoquait une augmentation de la mort neuronale, démontrant le rôle clef des CGE dans le contrôle de la survie des neurones entériques en situation physiologique.

En utilisant un modèle de co-culture, nous avons montré que des facteurs sécrétés par les CGE étaient en partie à l'origine de leurs effets neuroprotecteurs. La neuroprotection observée suite à un stress oxydant est cependant plus marquée dans un système de co-culture directe entre les deux types cellulaires. Cet effet "distance" peut suggérer que le contact direct entre neurones et CGE ait un rôle synergique, accentuant l'effet des facteurs sécrétés par les CGE, et/ou que ces facteurs ont une durée de vie très courte dans le milieu. Une explication alternative serait l'existence de jonctions communicantes (Gap junctions) qui permettrait l'échange des facteurs diffusibles neuroprotecteurs. De telles jonctions neuro-astrocytaires ont été objectivées dans des cultures primaires de SNC (Froes et al. 1999) ; leur existence reste à établir dans le SNE.

Nous avons mis en évidence deux facteurs produits par les CGE responsables au moins en partie de leurs effets neuroprotecteurs : le glutathion réduit et la prostaglandine 15d-PGJ₂. L'effet protecteur est observé à court terme par action directe avec le glutathion réduit, et à long terme par action préventive avec la 15d-PGJ₂.

Le glutathion réduit, tripeptide produit et synthétisé par toutes les cellules en quantité variables, est considéré comme le principal agent antioxydant non enzymatique. Le rôle du glutathion comme médiateur des effets neuroprotecteurs des astrocytes a été établi dans le SNC (Dringen and Hirrlinger 2003; Shih et al. 2003). En utilisant à la fois des approches génétiques et pharmacologiques, nous

avons montré par analogie que le glutathion produit par les CGE sous sa forme réduite est responsable au moins en partie des effets neuroprotecteurs des CGE. Les effets du glutathion sont directs et extracellulaires. La reproduction de ces effets du glutathion dans un modèle de culture *ex vivo* de plexus myentérique de rat a permis de confirmer les effets du glutathion dans un modèle intégré.

La prostaglandine 15d-PGJ₂ est une molécule identifiée récemment au laboratoire (Bach-Ngohou et al. en préparation). Cette molécule produite et sécrétée par les CGE a déjà fait l'objet de nombreuses études au niveau du SNC. Ses effets protecteurs vis-à-vis du stress induit par le glutamate, le monoxyde d'azote et l'H₂O₂ ont été bien établis (Aoun et al. 2003; Aoun et al. 2003; Lim et al. 2004). Nous avons donc démontré que la 15d-PGJ₂ est responsable en partie des effets préventifs des CGE.

L'ensemble de nos résultats permettent d'identifier deux voies distinctes responsables des effets neuroprotecteurs des CGE. La première voie est une voie directe et rapide qui consiste à modifier le microenvironnement et bloquer les agents pro-oxydants ou leurs effets sur le neurone. La seconde voie est plutôt une voie préventive à long terme qui consiste à augmenter les capacités de défense du neurone en stimulant ses voies antioxydantes ou anti-apoptotiques (Figure 22).

D'autres facteurs pourraient être impliqués dans la neuroprotection des CGE. Ainsi, le GDNF (Glial derived neurotrophic factor), le NGF (Nerve growth factor), et le TGF-β1 (transforming growth factor-β1) sont tous produits par les CGE (Bar et al. 1997; von Boyen et al. 2006; Neunlist et al. 2007). Le rôle neuroprotecteur du GDNF dans le SNE a déjà été montré lors d'un stress oxydant induit par l'hyperglycémie (Anitha et al. 2006; Anitha et al. 2006). Concernant le NGF, nous avons montré qu'il est capable de protéger les neurones entérique lors d'un stress oxydant (Moriez et al. 2009). Le TGF-β1, produit par les astrocytes, s'est montré neuroprotecteur dans le SNC (Dhandapani and Brann 2003; Dhandapani et al. 2003), mais à notre connaissance, son éventuel rôle neuroprotecteur dans le SNE n'a jamais été étudié.

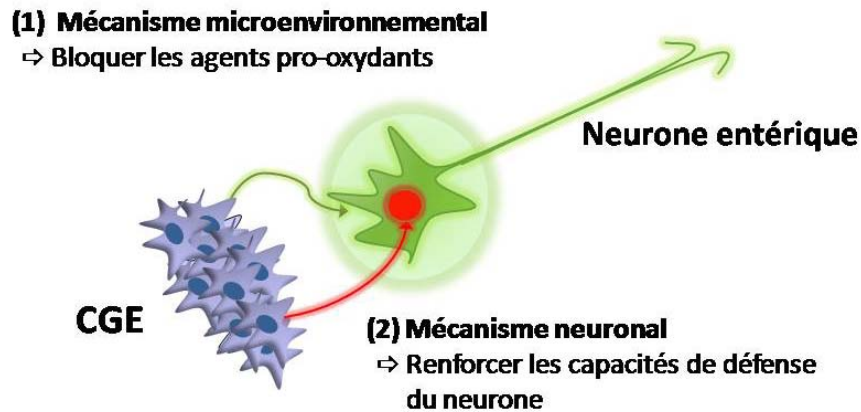


Figure 22: Mécanismes de neuroprotection par les cellules gliales entériques.

Les effets neuroprotecteurs des cellules gliales entériques (CGE) pourraient être dus à deux mécanismes distincts. Le premier mécanisme direct permettrait une action sur le microenvironnement neuronal, permettant de bloquer les agents oxydants ou leurs effets toxiques sur le neurone entérique. Un second mécanisme préventif agirait à plus long terme et permettrait d'augmenter les capacités de défense du neurone en stimulant ses capacités antioxydantes ou en inhibant les voies de mort cellulaire programmée comme la voie apoptotique.

Nos travaux soulignent le rôle important que jouent les CGE dans le contrôle de la survie neuronale. En réalité, plusieurs travaux publiés ces dernières années montrent que les CGE sont des régulateurs de l'ensemble des fonctions neuronales. Outre leur rôle structural comme cellules de soutien du réseau nerveux, les CGE interviennent dans le contrôle de la neurotransmission. Tout comme les astrocytes du SNC, les CGE expriment préférentiellement certaines enzymes nécessaires à la synthèse et à la dégradation des neurotransmetteurs (Nagahama et al. 2001; Braun et al. 2004; Ruhl et al. 2005). Ceci leur permet de contrôler directement la disponibilité en neuromédiateurs au niveau de l'espace synaptique afin d'optimiser la neurotransmission, tout en empêchant les effets toxiques de certains neuromédiateurs comme le glutamate (Jessen and Mirsky 1983). Par ailleurs, l'expression de canaux potassiques voltage-dépendants par les CGE est un moyen de modifier la concentration extracellulaire d'ions K^+ , dont l'accumulation peut

affecter l'activité neuronale (Hanani et al. 2000). La modification du codage neurochimique consécutive à l'ablation partielle des CGE dans un modèle de souris transgénique (Aube et al. 2006) confirme l'importance des CGE dans la modulation des fonctions neuronales et la synthèse des neuromédiateurs.

Situées à proximité des corps neuronaux et des fibres interganglionnaires, les CGE sont aussi très proches des autres composantes cellulaires du tissu digestif comme les cellules épithéliales intestinales (CEI), les cellules endothéliales et les fibroblastes et pourraient être impliquées dans le contrôle des fonctions physiologiques de ces cellules. De fait de leur proximité avec les CEI, les CGE pourraient directement moduler le contrôle de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Ces interactions n'ont fait l'objet que de peu d'études.

Le rôle bénéfique et protecteur des CGE dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI a pu être démontré dans un modèle transgénique *in vivo*, dans lequel l'ablation spécifique des CGE entraîne des altérations profondes de l'intégrité de la BEI (Bush et al. 1998). *In vitro* les CGE sont capable de contrôler directement la perméabilité paracellulaire de la BEI (Savidge et al. 2007). Les CGE contrôlent la prolifération et l'étalement des CEI (Neunlist et al. 2007), favorisent la différenciation et l'adhésion des CEI et activent les processus de réparation de la BEI après une lésion (Van Landeghem et al. 2009 en révision). Des travaux récents de notre laboratoire montrent par ailleurs que les CGE protègent la BEI de l'invasion par *Shigella flexneri* (Flamant et al, en préparation).

Nous savons par ailleurs qu'il existe un contrôle direct des fonctions de la BEI par les neurones entériques. Ce contrôle consiste à moduler à la fois la prolifération des CEI (Toumi et al. 2003) ainsi que la perméabilité épithéliale (Hayden and Carey 2000; Neunlist et al. 2003; Cameron and Perdue 2007). La présence d'interactions complexes entre les CGE, les neurones entériques et les CEI suggère l'existence d'une unité neuro-glio-épithéliale au sein du tube digestif (Figure 23). Cette unité semble comparable à l'unité neuro-glio-endothéliale de la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau du SNC (Savidge et al. 2007; Neunlist et al. 2008). Elle

semble cruciale au maintien de l'homéostasie du système gastro-intestinal. Confortant ce concept, des lésions spécifiques touchant l'une de ces trois composantes provoquent des atteintes irréversibles du tube digestif. En particulier des altérations des CGE ont été décrites au cours des pathologies digestives (Bassotti et al. 2005; Bassotti et al. 2006; da Silveira et al. 2009) et sont associées à des atteintes de la BEI (Cabarrocas et al. 2003) et/ou à une dégénérescence des neurones entériques (Bassotti et al. 2007).

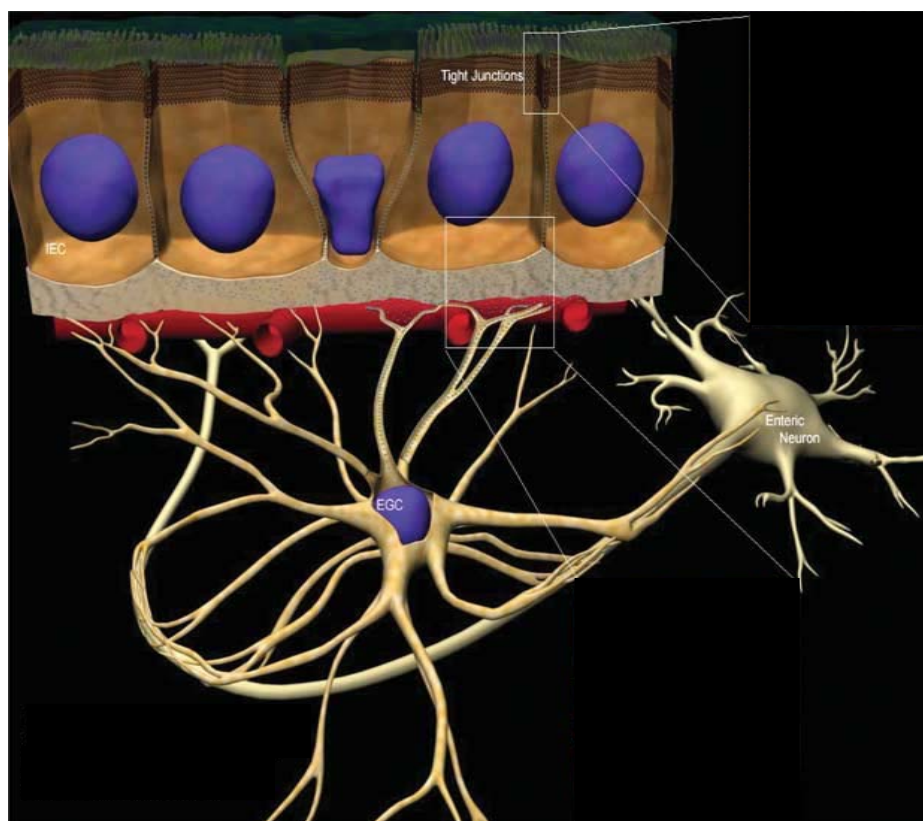


Figure 23 : Unité neuro-glio- épithéliale au sein du tube digestif

Ce schéma permet d'illustrer les interactions multidirectionnelles entre les neurones entériques (Enteric neuron), les cellules gliales entériques (EGC) et les cellules épithéliales intestinales (IEC). La position en premier plan de la cellule gliale entérique (EGC) met en évidence son rôle central au sein de l'unité neuro-glio-épithéliale. D'après Savidge et al 2007.

2 Atteinte des cellules gliales entériques au cours des neuropathies entériques : Concept de neurogliopathies

Comme précédemment décrit, nos résultats montrent le rôle clef des CGE dans le contrôle de la survie neuronale. Ce rôle, mis en évidence grâce au modèle de cultures primaires de SNE est également souligné dans le cadre des neuropathies entériques. Regroupant l'ensemble des pathologies associées à une atteinte plus ou moins profonde du SNE, le concept émergent de neuropathies entériques est encore assez mal délimité (tableau II). Les neuropathies entériques sont habituellement définies par une neurodégénérescence et/ou une altération des propriétés neuronales.

Quelques études décrivent l'atteinte contemporaine des CGE dans certaines neuropathies entériques. Les exemples regroupent des pathologies de la motricité intestinale (diverticulose, constipation sévère) (Bassotti et al. 2005; Bassotti et al. 2006), des pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn et l'entérocolite nécrosante (Geboes et al. 1992; Wedel et al. 1998; Cabarrocas et al. 2003) ou des pathologies infectieuses comme la maladie de Chagas (da Silveira et al. 2009). Une étude récente montre le ciblage spécifique des CGE par le JC virus chez les patients atteints de pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC), ce qui laisse supposer que l'atteinte neuronale responsable de la dysmotilité soit secondaire à une atteinte gliale primitive (Selgrad et al. 2009). De plus, l'analyse immunohistochimique du marqueur glial S100 β sur des segments coliques prélevés chez des patients atteints de cancers colo-rectaux montre une altération du réseau des CGE à distance de la tumeur, suggérant que la perte de CGE pourrait favoriser les processus de carcinogénèse (Neunlist et al. 2007).

L'altération des CGE serait donc associée à l'initiation et/ou à l'évolution de ces pathologies. Cette hypothèse est renforcée par les modèles expérimentaux induisant des lésions spécifiques des CGE. *In vivo*, dans les modèles animaux,

l'ablation totale des CGE provoque une inflammation intestinale sévère (Bush et al. 1998; Cornet et al. 2001) ainsi qu'une dégénérescence neuronale (Bush et al. 1998). Des lésions plus modérées des CGE sont associées à une modification du codage neurochimique et à une altération de la perméabilité intestinale (Aube et al. 2006). Dans notre étude, l'ablation de CGE induite au sein des cultures primaires permet de reproduire *in vitro* l'ablation induite dans ces modèles animaux. Ce modèle, quoique réductionniste, exclut l'implication des composantes immunitaire et inflammatoire et confirme l'effet direct des CGE sur la survie des neurones entériques. Les modifications induites du phénotype neurochimique dans ces cultures primaires dépourvues de CGE feront l'objet d'études ultérieures.

Notre étude montre le ciblage spécifique des CGE par les particules adénovirales. Les données publiées récemment par Selgrad montrant une infection ciblée des CGE par le JC virus constituent un deuxième exemple du tropisme de certains virus pour la glie entérique (Selgrad et al. 2009). Ces deux exemples suggèrent que les CGE seraient atteintes précocement par rapport aux autres composantes cellulaires et bien avant les neurones entériques et les CEI.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle neuroprotecteur des CGE dans une situation de stress oxydant. La plupart des pathologies inflammatoires et infectieuses sont étroitement associées à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) suite à l'activation des cellules immunitaires (Geboes 1994). Ces ERO, dirigées contre les agents infectieux, vont aussi attaquer les cellules avoisinantes et notamment les neurones, particulièrement sensibles au stress oxydant. De plus, Les ERO d'origine bactérienne ou nutritionnelle sont produits en permanence dans la lumière digestive (Aw 1997; Potoka et al. 2002; Aw 2005). Les neurones entériques, situés à proximité de la lumière, représentent donc une cible directe de ces ERO. En situation normale, la neuroprotection assurée par les CGE représente schématiquement une "bulle" de protection qui va prévenir les effets neurotoxiques de ces molécules pro-oxydantes. Cependant, l'atteinte de la population gliale induite lors des différentes neuropathies entériques provoque une

rupture de cette “bulle” ce qui rend les neurones particulièrement susceptibles au stress oxydant omniprésent.

Nos travaux confirment le rôle neuroprotecteur des CGE qui assurent le contrôle de la survie neuronale à la fois dans des conditions physiologiques mais également dans des situations de stress souvent associées aux différentes pathologies.

Conclusion et perspectives

Nos travaux sont les premiers à montrer directement que les CGE sont neuroprotectrices. En utilisant un modèle pluricellulaire différencié, nous avons démontré l'effet neuroprotecteur direct des CGE et nous avons identifié deux facteurs potentiels sécrétés par les CGE et impliqués dans cette neuroprotection. Ces deux facteurs, le glutathion réduit (GSH) et la prostaglandine 15d-PGJ₂ agiraient par deux voies distinctes et complémentaires. Le GSH, avec son action antioxydante, agirait par une voie directe et rapide permettant de neutraliser les molécules pro-oxydantes présentes dans le microenvironnement des neurones. A l'inverse, la 15d-PGJ₂ serait impliquée dans les voies de protection préventives et à long terme. Ces voies permettraient de modifier le phénotype du neurone afin d'augmenter ses capacités de défense. En effet, la 15d-PGJ₂ est capable d'activer différentes voies de signalisation, principalement les voies PPAR γ , Nrf2 et NF κ B. Nous avons montré dans un premier temps que les effets protecteurs de la 15d-PGJ₂ sont indépendants de la voie PPAR γ dans ce contexte de neuroprotection. Il reste donc à identifier les voies activées au sein des cellules neuronales en présence de 15d-PGJ₂ d'origine gliale.

D'autres molécules sont probablement produites par les CGE et pourraient jouer un rôle dans la neuroprotection et dans le contrôle des fonctions neuronales. Aussi il serait intéressant d'aller plus avant dans la caractérisation des différents médiateurs gliaux ainsi que dans leurs rôles fonctionnels vis-à-vis des neurones et des autres composantes cellulaires, comme les cellules épithéliales intestinales. Il serait également important d'étudier l'effet d'un stress oxydant sur les différentes populations neuronales. Ceci permettrait de caractériser la susceptibilité de ces différentes populations au stress oxydant, d'une part, et d'étudier l'effet d'un stress chronique (induit par de faibles quantités d'espèces réactives de l'oxygène) sur le phénotype neurochimique du SNE, d'autre part.

A long terme, les CGE pourraient représenter une cible thérapeutique pour le traitement et la prévention des neuropathies entériques. En particulier, des apports nutritionnels (antioxydants, ω -6) permettant de renforcer les capacités de neuroprotection des CGE pourraient constituer un moyen de prévenir les atteintes gliales et neuronales associées à la mise en place des neuropathies entériques.

Références bibliographiques

- Aggestrup, S., R. Uddman, F. Sundler, J. Fahrenkrug, R. Hakanson, H. R. Sorensen and G. Hambræus** (1983). "Lack of vasoactive intestinal polypeptide nerves in esophageal achalasia." *Gastroenterology* **84**(5 Pt 1): 924-7.
- Agulhon, C., J. Petravicz, A. B. McMullen, E. J. Sweger, S. K. Minton, S. R. Taves, K. B. Casper, T. A. Fiacco and K. D. McCarthy** (2008). "What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology?" *Neuron* **59**(6): 932-46.
- Ahlman, H. and Nilsson** (2001). "The gut as the largest endocrine organ in the body." *Ann Oncol* **12 Suppl 2**: S63-8.
- Alarcon de la Lastra, C., S. Sanchez-Fidalgo, I. Villegas and V. Motilva** (2004). "New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists." *Curr Pharm Des* **10**(28): 3505-24.
- Albrecht, P. J., J. P. Dahl, O. K. Stoltzfus, R. Levenson and S. W. Levison** (2002). "Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival." *Exp Neurol* **173**(1): 46-62.
- Almeida, A., J. Almeida, J. P. Bolanos and S. Moncada** (2001). "Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15294-9.
- Anitha, M., B. Chandrasekharan, J. R. Salgado, E. Grouzmann, S. Mwangi, S. V. Sitaraman and S. Srinivasan** (2006). "Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y." *Gastroenterology* **131**(4): 1164-78.
- Anitha, M., C. Gondha, R. Sutliff, A. Parsadanian, S. Mwangi, S. V. Sitaraman and S. Srinivasan** (2006). "GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway." *J Clin Invest* **116**(2): 344-56.
- Anlauf, M., M. K. Schafer, L. Eiden and E. Weihe** (2003). "Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes." *J Comp Neurol* **459**(1): 90-111.
- Anwar, A. A., F. Y. Li, D. S. Leake, T. Ishii, G. E. Mann and R. C. Siow** (2005). "Induction of heme oxygenase 1 by moderately oxidized low-density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells: role of mitogen-activated protein kinases and Nrf2." *Free Radic Biol Med* **39**(2): 227-36.
- Aoun, P., J. W. Simpkins and N. Agarwal** (2003). "Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(7): 2999-3004.
- Aoun, P., D. G. Watson and J. W. Simpkins** (2003). "Neuroprotective effects of PPARgamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells." *Eur J Pharmacol* **472**(1-2): 65-71.
- Arthur, J. R.** (2000). "The glutathione peroxidases." *Cell Mol Life Sci* **57**(13-14): 1825-35.
- Arundine, M. and M. Tymianski** (2004). "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury." *Cell Mol Life Sci* **61**(6): 657-68.

- Assuncao Guimaraes, C. and R. Linden** (2004). "Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles." Eur J Biochem **271**(9): 1638-50.
- Aube, A. C., J. Cabarocas, J. Bauer, D. Philippe, P. Aubert, F. Doulay, R. Liblau, J. P. Galmiche and M. Neunlist** (2006). "Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption." Gut **55**(5): 630-7.
- Auerbach, L.** (1864). "Fernere vorlaufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes." Arch. Pathol. Anat. Physiol.(30): 457-460.
- Aw, T. Y.** (1997). "Luminal peroxides in intestinal thiol-disulfide balance and cell turnover." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **118**(3): 479-85.
- Aw, T. Y.** (1999). "Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine." Am J Clin Nutr **70**(4): 557-65.
- Aw, T. Y.** (2005). "Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility." Toxicol Appl Pharmacol **204**(3): 320-8.
- Bains, J. S. and C. A. Shaw** (1997). "Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death." Brain Res Brain Res Rev **25**(3): 335-58.
- Bakhiet, M., A. Tjernlund, A. Mousa, A. Gad, S. Stromblad, W. A. Kuziel, A. Seiger and J. Andersson** (2001). "RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes." Nat Cell Biol **3**(2): 150-7.
- Banci, L., M. Benedetto, I. Bertini, R. Del Conte, M. Piccoli and M. S. Viezzoli** (1998). "Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme?" Biochemistry (Mosc) **37**(34): 11780-91.
- Bar, K. J., P. Facer, N. S. Williams, P. K. Tam and P. Anand** (1997). "Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease." Gastroenterology **112**(4): 1381-5.
- Barber, S. C., R. J. Mead and P. J. Shaw** (2006). "Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1762**(11-12): 1051-67.
- Baregamian, N., J. M. Mourot, A. R. Ballard, B. M. Evers and D. H. Chung** (2009). "PPAR-gamma agonist protects against intestinal injury during necrotizing enterocolitis." Biochem Biophys Res Commun **379**(2): 423-7.
- Barlow, A., E. de Graaff and V. Pachnis** (2003). "Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET." Neuron **40**(5): 905-16.
- Barondeau, D. P., C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer and E. D. Getzoff** (2004). "Nickel superoxide dismutase structure and mechanism." Biochemistry (Mosc) **43**(25): 8038-47.
- Barouki, R. and Y. Morel** (2001). "Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications." Biochem Pharmacol **61**(5): 511-6.
- Barres, B. A.** (2008). "The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease." Neuron **60**(3): 430-40.
- Bassotti, G., E. Battaglia, G. Bellone, L. Dughera, S. Fisogni, C. Zambelli, A. Morelli, P. Mioli, G. Emanuelli and V. Villanacci** (2005). "Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease." J Clin Pathol **58**(9): 973-7.
- Bassotti, G., V. Villanacci, S. Fisogni, E. Rossi, P. Baronio, C. Clerici, C. A. Maurer, G. Cathomas and E. Antonelli** (2007). "Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies." World J Gastroenterol **13**(30): 4035-41.

- Bassotti, G., V. Villanacci, C. A. Maurer, S. Fisogni, F. Di Fabio, M. Cadei, A. Morelli, T. Panagiotis, G. Cathomas and B. Salerni** (2006). "The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation." *Gut* **55**(1): 41-6.
- Baumgarten, H. G., A. F. Holstein and C. Owman** (1970). "Auerbach's plexus of mammals and man: electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkeys, guinea-pigs and man." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **106**(3): 376-97.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling** (1899). "The movements and innervation of the small intestine." *J Physiol* **24**(2): 99-143.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling** (1900). "The movements and the innervation of the large intestine." *J Physiol* **26**(1-2): 107-18.
- Beck, D. W., H. V. Vinters, M. N. Hart and P. A. Cancilla** (1984). "Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier." *J Neuropathol Exp Neurol* **43**(3): 219-24.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames** (1997). "Oxidative decay of DNA." *J Biol Chem* **272**(32): 19633-6.
- Bergles, D. E. and C. E. Jahr** (1998). "Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus." *J Neurosci* **18**(19): 7709-16.
- Berlett, B. S. and E. R. Stadtman** (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." *J Biol Chem* **272**(33): 20313-6.
- Bhor, V. M., N. Raghuram and S. Sivakami** (2004). "Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(1): 89-97.
- Bjerknes, M. and H. Cheng** (2001). "Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12497-502.
- Bjornstedt, M., J. Xue, W. Huang, B. Akesson and A. Holmgren** (1994). "The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase." *J Biol Chem* **269**(47): 29382-4.
- Blaugrund, E., T. D. Pham, V. M. Tennyson, L. Lo, L. Sommer, D. J. Anderson and M. D. Gershon** (1996). "Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence." *Development* **122**(1): 309-20.
- Bondurand, N., D. Natarajan, A. Barlow, N. Thapar and V. Pachnis** (2006). "Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling." *Development* **133**(10): 2075-86.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joosse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra and P. Heutink** (2003). "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism." *Science* **299**(5604): 256-9.
- Bornstein, J. C., J. B. Furness and W. A. Kunze** (1994). "Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate?" *J Auton Nerv Syst* **48**(1): 1-15.
- Braak, H. and K. Del Tredici** (2009). "Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease." *Adv Anat Embryol Cell Biol* **201**: 1-119.
- Braun, N., J. Sevigny, S. C. Robson, K. Hammer, M. Hanani and H. Zimmermann** (2004). "Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system." *Glia* **45**(2): 124-32.
- Braun, S., C. Hanselmann, M. G. Gassmann, U. auf dem Keller, C. Born-Berclaz, K. Chan, Y. W. Kan and S. Werner** (2002). "Nrf2 transcription factor, a novel target of

- keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5492-505.
- Brehmer, A., F. Schrodler and W. Neuhuber** (1999). "Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel." *Anat Embryol (Berl)* **200**(2): 125-35.
- Britsch, S., D. E. Goerich, D. Riethmacher, R. I. Peirano, M. Rossner, K. A. Nave, C. Birchmeier and M. Wegner** (2001). "The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development." *Genes Dev* **15**(1): 66-78.
- Bruno, V., G. Battaglia, A. Copani, M. D'Onofrio, P. Di Iorio, A. De Blasi, D. Melchiorri, P. J. Flor and F. Nicoletti** (2001). "Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs." *J Cereb Blood Flow Metab* **21**(9): 1013-33.
- Buffinton, G. D. and W. F. Doe** (1995). "Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease." *Free Radic Biol Med* **19**(6): 911-8.
- Burk, R. F. and K. E. Hill** (2005). "Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis." *Annu Rev Nutr* **25**: 215-35.
- Burns, A. J. and N. M. Le Douarin** (2001). "Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras." *Anat Rec* **262**(1): 16-28.
- Bush, T. G., T. C. Savidge, T. C. Freeman, H. J. Cox, E. A. Campbell, L. Mucke, M. H. Johnson and M. V. Sofroniew** (1998). "Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice." *Cell* **93**(2): 189-201.
- Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman** (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J Neurosci* **22**(1): 183-92.
- Cabarrocas, J., T. C. Savidge and R. S. Liblau** (2003). "Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease." *Glia* **41**(1): 81-93.
- Cacalano, G., I. Farinas, L. C. Wang, K. Hagler, A. Forgie, M. Moore, M. Armanini, H. Phillips, A. M. Ryan, L. F. Reichardt, M. Hynes, A. Davies and A. Rosenthal** (1998). "GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." *Neuron* **21**(1): 53-62.
- Cajal, S. R. Y.** (1893). "Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin." *C. R. Soc. Biol.* **5**: 217-223.
- Cameron, H. L. and M. H. Perdue** (2007). "Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro." *Neurogastroenterol Motil* **19**(1): 47-56.
- Camilleri, M.** (2001). "Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insights for the neurogastroenterologist." *Neurogastroenterol Motil* **13**(4): 277-95.
- Cande, C., F. Cecconi, P. Dessen and G. Kroemer** (2002). "Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?" *J Cell Sci* **115**(Pt 24): 4727-34.
- Cande, C., I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami and G. Kroemer** (2002). "Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria." *Biochimie* **84**(2-3): 215-22.
- Carlson, N. G., W. A. Wiegand, J. Chen, A. Bacchi, S. W. Rogers and L. C. Gahring** (1999). "Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways." *J Immunol* **163**(7): 3963-8.
- Carr, A. C., T. Tijerina and B. Frei** (2000). "Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density lipoprotein." *Biochem J* **346 Pt 2**: 491-9.

- Catala, A.** (2009). "Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions." *Chem Phys Lipids* **157**(1): 1-11.
- Chabory, E., C. Damon, A. Lenoir, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, C. Garrel, F. Saez, R. Cadet, J. Henry-Berger, M. Schoor, U. Gottwald, U. Habenicht, J. R. Drevet and P. Vernet** (2009). "Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice." *J Clin Invest* **119**(7): 2074-85.
- Chakravarti, B. and D. N. Chakravarti** (2007). "Oxidative modification of proteins: age-related changes." *Gerontology* **53**(3): 128-39.
- Chalazonitis, A., F. D'Autreaux, U. Guha, T. D. Pham, C. Faure, J. J. Chen, D. Roman, L. Kan, T. P. Rothman, J. A. Kessler and M. D. Gershon** (2004). "Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset." *J Neurosci* **24**(17): 4266-82.
- Chalazonitis, A., T. P. Rothman, J. Chen, E. N. Vinson, A. J. MacLennan and M. D. Gershon** (1998). "Promotion of the development of enteric neurons and glia by neurotrophic cytokines: interactions with neurotrophin-3." *Dev Biol* **198**(2): 343-65.
- Chamberlin, W., D. Y. Graham, K. Hulten, H. M. El-Zimaity, M. R. Schwartz, S. Naser, I. Shafran and F. A. El-Zaatari** (2001). "Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease." *Aliment Pharmacol Ther* **15**(3): 337-46.
- Chandra, J., A. Samali and S. Orrenius** (2000). "Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **29**(3-4): 323-33.
- Chandrasekharan, B. and S. Srinivasan** (2007). "Diabetes and the enteric nervous system." *Neurogastroenterol Motil* **19**(12): 951-60.
- Chatton, J. Y., P. Marquet and P. J. Magistretti** (2000). "A quantitative analysis of L-glutamate-regulated Na⁺ dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenergetics." *Eur J Neurosci* **12**(11): 3843-53.
- Chen, C. J., S. L. Liao and J. S. Kuo** (2000). "Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes." *J Neurochem* **75**(4): 1557-65.
- Chen, Z. H., Y. Yoshida, Y. Saito, A. Sekine, N. Noguchi and E. Niki** (2006). "Induction of adaptive response and enhancement of PC12 cell tolerance by 7-hydroxycholesterol and 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 through up-regulation of cellular glutathione via different mechanisms." *J Biol Chem* **281**(20): 14440-5.
- Chevalier, J., P. Derkinderen, P. Gomes, R. Thinard, P. Naveilhan, P. Vanden Berghe and M. Neunlist** (2008). "Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system." *J Physiol* **586**(7): 1963-75.
- Chinta, S. J. and J. K. Andersen** (2008). "Redox imbalance in Parkinson's disease." *Biochim Biophys Acta* **1780**(11): 1362-7.
- Cho, H. Y., A. E. Jedlicka, S. P. Reddy, T. W. Kensler, M. Yamamoto, L. Y. Zhang and S. R. Kleeberger** (2002). "Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(2): 175-82.
- Cho, Y. and S. Bannai** (1990). "Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes." *J Neurochem* **55**(6): 2091-7.
- Christopherson, K. S., E. M. Ullian, C. C. Stokes, C. E. Mullaney, J. W. Hell, A. Agah, J. Lawler, D. F. Mosher, P. Bornstein and B. A. Barres** (2005). "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis." *Cell* **120**(3): 421-33.
- Chu, F. F., R. S. Esworthy, J. H. Doroshov, K. Doan and X. F. Liu** (1992). "Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents." *Blood* **79**(12): 3233-8.

- Clancy, R. M., D. Levartovsky, J. Leszczynska-Piziak, J. Yegudin and S. B. Abramson** (1994). "Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3680-4.
- Clement, M. V., L. H. Long, J. Ramalingam and B. Halliwell** (2002). "The cytotoxicity of dopamine may be an artefact of cell culture." J Neurochem **81**(3): 414-21.
- Clements, J. D., R. A. Lester, G. Tong, C. E. Jahr and G. L. Westbrook** (1992). "The time course of glutamate in the synaptic cleft." Science **258**(5087): 1498-501.
- Combs, C. K., D. E. Johnson, J. C. Karlo, S. B. Cannady and G. E. Landreth** (2000). "Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists." J Neurosci **20**(2): 558-67.
- Cook, R. D. and G. Burnstock** (1976). "The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements." J Neurocytol **5**(2): 195-206.
- Cooke, H. J.** (2000). "Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion." Ann N Y Acad Sci **915**: 77-80.
- Cornet, A., T. C. Savidge, J. Cabarrocas, W. L. Deng, J. F. Colombel, H. Lassmann, P. Desreumaux and R. S. Liblau** (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**(23): 13306-11.
- Costa, M., S. J. Brookes and G. W. Hennig** (2000). "Anatomy and physiology of the enteric nervous system." Gut **47 Suppl 4**: iv15-9; discussion iv26.
- Costa, M., S. J. Brookes, P. A. Steele, I. Gibbins, E. Burcher and C. J. Kandiah** (1996). "Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum." Neuroscience **75**(3): 949-67.
- Crone, S. A., A. Negro, A. Trumpp, M. Giovannini and K. F. Lee** (2003). "Colonic epithelial expression of ErbB2 is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system." Neuron **37**(1): 29-40.
- Croteau, D. L. and V. A. Bohr** (1997). "Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells." J Biol Chem **272**(41): 25409-12.
- Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper and J. A. Diehl** (2004). "The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase." Mol Cell Biol **24**(19): 8477-86.
- Cuzzocrea, S., B. Pisano, L. Dugo, A. Ianaro, N. S. Patel, R. Di Paola, T. Genovese, P. K. Chatterjee, M. Di Rosa, A. P. Caputi and C. Thiemermann** (2003). "Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut." Br J Pharmacol **140**(2): 366-76.
- da Silveira, A. B., M. A. Freitas, E. C. de Oliveira, S. G. Neto, A. O. Luquetti, J. B. Furness, R. Correa-Oliveira and D. Reis** (2009). "Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients." Hum Pathol **40**(2): 244-51.
- Danielson, S. R. and J. K. Andersen** (2008). "Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease." Free Radic Biol Med **44**(10): 1787-94.
- De Giorgio, R., M. Bovera, G. Barbara, M. Canossa, G. Sarnelli, F. De Ponti, V. Stanghellini, M. Tonini, S. Cappello, E. Pagnotta, E. Nobile-Orazio and R. Corinaldesi** (2003). "Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility." Gastroenterology **125**(1): 70-9.
- De Giorgio, R. and M. Camilleri** (2004). "Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology." Neurogastroenterol Motil **16**(5): 515-31.

- De Giorgio, R., M. P. Di Simone, V. Stanghellini, G. Barbara, M. Tonini, B. Salvioli, S. Mattioli and R. Corinaldesi** (1999). "Esophageal and gastric nitric oxide synthesizing innervation in primary achalasia." *Am J Gastroenterol* **94**(9): 2357-62.
- Dhandapani, K. M. and D. W. Brann** (2003). "Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia." *Cell Biochem Biophys* **39**(1): 13-22.
- Dhandapani, K. M., M. Hadman, L. De Sevilla, M. F. Wade, V. B. Mahesh and D. W. Brann** (2003). "Astrocyte protection of neurons: role of transforming growth factor-beta signaling via a c-Jun-AP-1 protective pathway." *J Biol Chem* **278**(44): 43329-39.
- Di Nardo, G., C. Blandizzi, U. Volta, R. Colucci, V. Stanghellini, G. Barbara, M. Del Tacca, M. Tonini, R. Corinaldesi and R. De Giorgio** (2008). "Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies." *Aliment Pharmacol Ther* **28**(1): 25-42.
- Dignass, A. U., A. Becker, S. Spiegler and H. Goebell** (1998). "Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro." *Eur J Clin Invest* **28**(7): 554-61.
- Dogiel, A.** (1899). "Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Sa"ugetiere." *Arch Anat Physiol (Leipzig)* (Anat Abt Jg 1899): 130-158.
- Dringen, R.** (2000). "Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration." *Eur J Biochem* **267**(16): 4903.
- Dringen, R.** (2000). "Metabolism and functions of glutathione in brain." *Prog Neurobiol* **62**(6): 649-71.
- Dringen, R., R. Gebhardt and B. Hamprecht** (1993). "Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells." *Brain Res* **623**(2): 208-14.
- Dringen, R., J. M. Gutterer and J. Hirrlinger** (2000). "Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species." *Eur J Biochem* **267**(16): 4912-6.
- Dringen, R. and J. Hirrlinger** (2003). "Glutathione pathways in the brain." *Biol Chem* **384**(4): 505-16.
- Duyckaerts, C., B. Delatour and M. C. Potier** (2009). "Classification and basic pathology of Alzheimer disease." *Acta Neuropathol* **118**(1): 5-36.
- Ekblad, E., C. Winther, R. Ekman, R. Hakanson and F. Sundler** (1987). "Projections of peptide-containing neurons in rat small intestine." *Neuroscience* **20**(1): 169-88.
- Enomoto, A., K. Itoh, E. Nagayoshi, J. Haruta, T. Kimura, T. O'Connor, T. Harada and M. Yamamoto** (2001). "High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes." *Toxicol Sci* **59**(1): 169-77.
- Ercal, N., H. Gurer-Orhan and N. Aykin-Burns** (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage." *Curr Top Med Chem* **1**(6): 529-39.
- Esterbauer, H., J. Gebicki, H. Puhl and G. Jurgens** (1992). "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." *Free Radic Biol Med* **13**(4): 341-90.
- Favier, A.** (2006). "[Oxidative stress in human diseases]." *Ann Pharm Fr* **64**(6): 390-6.
- Favreau, L. V. and C. B. Pickett** (1991). "Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants." *J Biol Chem* **266**(7): 4556-61.
- Ferri, G. L., L. Probert, D. Cocchia, F. Michetti, P. J. Marangos and J. M. Polak** (1982). "Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system." *Nature* **297**(5865): 409-10.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson** (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infect Immun* **73**(4): 1907-16.

- Fletcher, E. L., M. J. Clark and J. B. Furness** (2002). "Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus." *Cell Tissue Res* **308**(3): 339-46.
- Flohe, L., W. A. Gunzler and H. H. Schock** (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." *FEBS Lett* **32**(1): 132-4.
- Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman and R. M. Evans** (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." *Cell* **83**(5): 803-12.
- Franklin, C. C., D. S. Backos, I. Mohar, C. C. White, H. J. Forman and T. J. Kavanagh** (2009). "Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase." *Mol Aspects Med* **30**(1-2): 86-98.
- Fridovich, I.** (1998). "Oxygen toxicity: a radical explanation." *J Exp Biol* **201**(Pt 8): 1203-9.
- Friling, R. S., A. Bensimon, Y. Tichauer and V. Daniel** (1990). "Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6258-62.
- Froes, M. M., A. H. Correia, J. Garcia-Abreu, D. C. Spray, A. C. Campos de Carvalho and M. V. Neto** (1999). "Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7541-6.
- Fu, M., P. K. Tam, M. H. Sham and V. C. Lui** (2004). "Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study." *Anat Embryol (Berl)* **208**(1): 33-41.
- Fukui, H. and C. T. Moraes** (2008). "The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?" *Trends Neurosci* **31**(5): 251-6.
- Furness, J. B.** (2000). "Types of neurons in the enteric nervous system." *J Auton Nerv Syst* **81**(1-3): 87-96.
- Furness, J. B., G. Alex, M. J. Clark and V. V. Lal** (2003). "Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **272**(2): 475-83.
- Furness, J. B., N. Clerc and W. A. Kunze** (2000). "Memory in the enteric nervous system." *Gut* **47 Suppl 4**: iv60-2; discussion iv76.
- Furness, J. B., N. Clerc, A. E. Lomax, J. C. Bornstein and W. A. Kunze** (2000). "Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine." *Cell Tissue Res* **300**(3): 383-7.
- Furness, J. B., M. Costa, A. Rokaeus, T. J. McDonald and B. Brooks** (1987). "Galanin-immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine: their projections and relationships to other enteric neurons." *Cell Tissue Res* **250**(3): 607-15.
- Furness, J. B., W. A. Kunze, P. P. Bertrand, N. Clerc and J. C. Bornstein** (1998). "Intrinsic primary afferent neurons of the intestine." *Prog Neurobiol* **54**(1): 1-18.
- Gabella, G.** (1971). "Glial cells in the myenteric plexus." *Z Naturforsch B* **26**(3): 244-5.
- Gabella, G.** (1981). "Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells." *Neuroscience* **6**(3): 425-36.
- Gabella, G.** (1990). "On the plasticity of form and structure of enteric ganglia." *J Auton Nerv Syst* **30 Suppl**: S59-66.
- Gabella, G. and P. Trigg** (1984). "Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep." *J Neurocytol* **13**(1): 49-71.
- Galligan, J. J., K. J. LePard, D. A. Schneider and X. Zhou** (2000). "Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system." *J Auton Nerv Syst* **81**(1-3): 97-103.
- Geboes, K.** (1994). "From inflammation to lesion." *Acta Gastroenterol Belg* **57**(5-6): 273-84.

- Geboes, K., P. Rutgeerts, N. Ectors, J. Mebis, F. Penninckx, G. Vantrappen and V. J. Desmet** (1992). "Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease." Gastroenterology **103**(2): 439-47.
- Gegg, M. E., B. Beltran, S. Salas-Pino, J. P. Bolanos, J. B. Clark, S. Moncada and S. J. Heales** (2003). "Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration?" J Neurochem **86**(1): 228-37.
- Gershon, M. D.** (1997). "Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system." Curr Opin Neurobiol **7**(1): 101-9.
- Gershon, M. D. and T. P. Rothman** (1991). "Enteric glia." Glia **4**(2): 195-204.
- Giron, M. D., R. Salto, Y. Gonzalez, J. A. Giron, N. Nieto, J. L. Periago, M. D. Suarez and P. Hortelano** (1999). "Modulation of hepatic and intestinal glutathione S-transferases and other antioxidant enzymes by dietary lipids in streptozotocin diabetic rats." Chemosphere **38**(13): 3003-13.
- Giustarini, D., R. Rossi, A. Milzani, R. Colombo and I. Dalle-Donne** (2004). "S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases." J Cell Mol Med **8**(2): 201-12.
- Goldblatt, M. W.** (1935). "Properties of human seminal plasma." J Physiol **84**(2): 208-18.
- Goyal, R. K. and I. Hirano** (1996). "The enteric nervous system." N Engl J Med **334**(17): 1106-15.
- Gregersen, H., K. Orvar and J. Christensen** (1992). "Biomechanical properties of duodenal wall and duodenal tone during phase I and phase II of the MMC." Am J Physiol **263**(5 Pt 1): G795-801.
- Hailer, N. P., F. Wirjatijasa, N. Roser, G. T. Hischebeth, H. W. Korf and F. Dehghani** (2001). "Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures." Eur J Neurosci **14**(2): 315-26.
- Hald, A., J. Van Beek and J. Lotharius** (2007). "Inflammation in Parkinson's disease: causative or epiphenomenal?" Subcell Biochem **42**: 249-79.
- Hallgren, A., G. Flemstrom and O. Nylander** (1998). "Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): G95-103.
- Hanani, M., M. Francke, W. Hartig, J. Grosche, A. Reichenbach and T. Pannicke** (2000). "Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**(4): G644-51.
- Hanani, M., O. Zamir and P. Baluk** (1989). "Glial cells in the guinea pig myenteric plexus are dye coupled." Brain Res **497**(2): 245-9.
- Hansen, M. B.** (2003). "Neurohumoral control of gastrointestinal motility." Physiol Res **52**(1): 1-30.
- Hansen, M. B. and E. Skadhauge** (1997). "Signal transduction pathways for serotonin as an intestinal secretagogue." Comp Biochem Physiol A Physiol **118**(2): 283-90.
- Hardin, J. A., M. H. Kimm, M. Wirasinghe and D. G. Gall** (1999). "Macromolecular transport across the rabbit proximal and distal colon." Gut **44**(2): 218-25.
- Hassel, B., R. E. Paulsen, A. Johnsen and F. Fonnum** (1992). "Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate." Brain Res **576**(1): 120-4.
- Hayakawa, M., T. Ogawa, S. Sugiyama, M. Tanaka and T. Ozawa** (1991). "Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine." Biochem Biophys Res Commun **176**(1): 87-93.

- Hayden, U. L. and H. V. Carey** (2000). "Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(6): R1589-94.
- Heanue, T. A. and V. Pachnis** (2007). "Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies." Nat Rev Neurosci **8**(6): 466-79.
- Hengartner, M. O.** (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.
- Henle, E. S. and S. Linn** (1997). "Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide." J Biol Chem **272**(31): 19095-8.
- Hirst, G. D., M. E. Holman and I. Spence** (1974). "Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig." J Physiol **236**(2): 303-326.
- Hodara, R., E. H. Norris, B. I. Giasson, A. J. Mishizen-Eberz, D. R. Lynch, V. M. Lee and H. Ischiropoulos** (2004). "Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation." J Biol Chem **279**(46): 47746-53.
- Hoehner, J. C., T. Wester, S. Pahlman and L. Olsen** (1996). "Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development." Gastroenterology **110**(3): 756-67.
- Hoff, S., F. Zeller, C. W. von Weyhern, M. Wegner, M. Schemann, K. Michel and A. Ruhl** (2008). "Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody." J Comp Neurol **509**(4): 356-71.
- Hopkins, F. G.** (1921). "On an Autoxidisable Constituent of the Cell." Biochem J **15**(2): 286-305.
- Houades, V., N. Rouach, P. Ezan, F. Kirchhoff, A. Koulakoff and C. Giaume** (2006). "Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain." Neuron Glia Biol **2**(1): 3-14.
- Huang, X., C. S. Atwood, M. A. Hartshorn, G. Multhaup, L. E. Goldstein, R. C. Scarpa, M. P. Cuajungco, D. N. Gray, J. Lim, R. D. Moir, R. E. Tanzi and A. I. Bush** (1999). "The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction." Biochemistry **38**(24): 7609-16.
- Hubel, K. A.** (1978). "The effects of electrical field stimulation and tetrodotoxin on ion transport by the isolated rabbit ileum." J Clin Invest **62**(5): 1039-47.
- Hussain, S., W. Slikker, Jr. and S. F. Ali** (1996). "Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection." Neurochem Int **29**(2): 145-52.
- Imai, H., K. Narashima, M. Arai, H. Sakamoto, N. Chiba and Y. Nakagawa** (1998). "Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." J Biol Chem **273**(4): 1990-7.
- Inauen, W., P. A. Wyss, S. Kayser, A. Baumgartner, C. C. Schurer-Maly, H. R. Koelz and F. Halter** (1988). "Influence of prostaglandins, omeprazole, and indomethacin on healing of experimental gastric ulcers in the rat." Gastroenterology **95**(3): 636-41.
- Ishii, T., K. Itoh, E. Ruiz, D. S. Leake, H. Unoki, M. Yamamoto and G. E. Mann** (2004). "Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal." Circ Res **94**(5): 609-16.
- Itoh, K., M. Mochizuki, Y. Ishii, T. Ishii, T. Shibata, Y. Kawamoto, V. Kelly, K. Sekizawa, K. Uchida and M. Yamamoto** (2004). "Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2)." Mol Cell Biol **24**(1): 36-45.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel and M. Yamamoto** (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by

- Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." Genes Dev **13**(1): 76-86.
- Janaky, R., K. Ogita, B. A. Pasqualotto, J. S. Bains, S. S. Oja, Y. Yoneda and C. A. Shaw** (1999). "Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS." J Neurochem **73**(3): 889-902.
- Janicke, R. U., M. L. Sprengart, M. R. Wati and A. G. Porter** (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." J Biol Chem **273**(16): 9357-60.
- Janzer, R. C. and M. C. Raff** (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." Nature **325**(6101): 253-7.
- Jenner, P.** (2003). "Oxidative stress in Parkinson's disease." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S26-36; discussion S36-8.
- Jessen, K. R.** (2004). "Glial cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(10): 1861-7.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky** (1980). "Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein." Nature **286**(5774): 736-7.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky** (1983). "Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia." J Neurosci **3**(11): 2206-18.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky** (1985). "Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution." J Neuroimmunol **8**(4-6): 377-93.
- Jiang, Y., M. T. Liu and M. D. Gershon** (2003). "Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas." Dev Biol **258**(2): 364-84.
- Jones, D.** (1942). "The origin of the vagi and the parasympathetic ganglion cells of the viscera of the chick." Anat. Rec. **82**: 185-197.
- Juin, P., P. F. Cartron and F. M. Vallette** (2005). "Activation of Bax by BH3 domains during apoptosis: the unfolding of a deadly plot." Cell Cycle **4**(5): 637-42.
- Kalinina, E. V., N. N. Chernov and A. N. Saprin** (2008). "Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes." Biochemistry (Mosc) **73**(13): 1493-510.
- Kamat, C. D., S. Gadal, M. Mhatre, K. S. Williamson, Q. N. Pye and K. Hensley** (2008). "Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges." J Alzheimers Dis **15**(3): 473-93.
- Kanaoka, Y., K. Fujimori, R. Kikuno, Y. Sakaguchi, Y. Urade and O. Hayaishi** (2000). "Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. Conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase." Eur J Biochem **267**(11): 3315-22.
- Kang, K. W., S. H. Choi and S. G. Kim** (2002). "Peroxyntirite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction." Nitric Oxide **7**(4): 244-53.
- Kang, M. I., A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S. G. Kim and M. Yamamoto** (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2046-51.
- Kaynar, H., M. Meral, H. Turhan, M. Keles, G. Celik and F. Akcay** (2005). "Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer." Cancer Lett **227**(2): 133-9.

- Kelsh, R. N.** (2006). "Sorting out Sox10 functions in neural crest development." Bioessays **28**(8): 788-98.
- Kerr, J. F., G. C. Gobe, C. M. Winterford and B. V. Harmon** (1995). "Anatomical methods in cell death." Methods Cell Biol **46**: 1-27.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Keshavarzian, A., A. Banan, A. Farhadi, S. Komanduri, E. Mutlu, Y. Zhang and J. Z. Fields** (2003). "Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease." Gut **52**(5): 720-8.
- Khalil, A.** (2002). "[Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin e against atherosclerosis]." Can J Physiol Pharmacol **80**(7): 662-9.
- Kikawa, Y., S. Narumiya, M. Fukushima, H. Wakatsuka and O. Hayaishi** (1984). "9-Deoxy-delta 9, delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(5): 1317-21.
- Kim, E. H. and Y. J. Surh** (2006). "15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors." Biochem Pharmacol **72**(11): 1516-28.
- Kimball, B. C. and M. W. Mulholland** (1996). "Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism." J Neurochem **66**(2): 604-12.
- Kirchgessner, A. L. and M. D. Gershon** (1988). "Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by retrograde and anterograde transport." J Comp Neurol **277**(4): 487-98.
- Kirchhoff, F., R. Dringen and C. Giaume** (2001). "Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **251**(4): 159-69.
- Kliwer, S. A., J. M. Lenhard, T. M. Willson, I. Patel, D. C. Morris and J. M. Lehmann** (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." Cell **83**(5): 813-9.
- Ko, T. P., M. K. Safo, F. N. Musayev, M. L. Di Salvo, C. Wang, S. H. Wu and D. J. Abraham** (2000). "Structure of human erythrocyte catalase." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 2): 241-5.
- Koh, S. H., B. Jung, C. W. Song, Y. Kim, Y. S. Kim and S. H. Kim** (2005). "15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a neuroprotectant or a neurotoxicant?" Toxicology **216**(2-3): 232-43.
- Kondo, M., T. Oya-Ito, T. Kumagai, T. Osawa and K. Uchida** (2001). "Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress." J Biol Chem **276**(15): 12076-83.
- Koppal, T., J. Drake and D. A. Butterfield** (1999). "In vivo modulation of rodent glutathione and its role in peroxynitrite-induced neocortical synaptosomal membrane protein damage." Biochim Biophys Acta **1453**(3): 407-11.
- Kuntz, A.** (1910). "The development of the sympathetic nervous system in mammals." J. Comp. Neurol.(20): 211 - 258.
- Kunze, W. A., N. Clerc, J. B. Furness and M. Gola** (2000). "The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation." J Physiol **526 Pt 2**: 375-85.
- Kunze, W. A. and J. B. Furness** (1999). "The enteric nervous system and regulation of intestinal motility." Annu Rev Physiol **61**: 117-42.
- Kurz, T., A. Terman and U. T. Brunk** (2007). "Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron." Arch Biochem Biophys **462**(2): 220-30.

- Lalier, L., P. F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger and F. M. Vallette** (2007). "Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis." Apoptosis **12**(5): 887-96.
- Langley, J. N. and R. Magnus** (1905). "Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves." J Physiol **33**(1): 34-51.
- Lee, J. M., M. J. Calkins, K. Chan, Y. W. Kan and J. A. Johnson** (2003). "Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis." J Biol Chem **278**(14): 12029-38.
- Levonen, A. L., A. Landar, A. Ramachandran, E. K. Ceaser, D. A. Dickinson, G. Zanoni, J. D. Morrow and V. M. Darley-Usmar** (2004). "Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products." Biochem J **378**(Pt 2): 373-82.
- Li, F., N. Y. Calingasan, F. Yu, W. M. Mauck, M. Toidze, C. G. Almeida, R. H. Takahashi, G. A. Carlson, M. Flint Beal, M. T. Lin and G. K. Gouras** (2004). "Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice." J Neurochem **89**(5): 1308-12.
- Lih-Brody, L., S. R. Powell, K. P. Collier, G. M. Reddy, R. Cerchia, E. Kahn, G. S. Weissman, S. Katz, R. A. Floyd, M. J. McKinley, S. E. Fisher and G. E. Mullin** (1996). "Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease." Dig Dis Sci **41**(10): 2078-86.
- Lim, S. Y., J. H. Jang, H. K. Na, S. C. Lu, I. Rahman and Y. J. Surh** (2004). "15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2) protects against nitrosative PC12 cell death through up-regulation of intracellular glutathione synthesis." J Biol Chem **279**(44): 46263-70.
- Lin, T. N., W. M. Cheung, J. S. Wu, J. J. Chen, H. Lin, J. J. Chen, J. Y. Liou, S. K. Shyue and K. K. Wu** (2006). "15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(3): 481-7.
- Little, A. R. and J. P. O'Callaghan** (2001). "Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines?" Neurotoxicology **22**(5): 607-18.
- Liu, B., H. M. Gao, J. Y. Wang, G. H. Jeohn, C. L. Cooper and J. S. Hong** (2002). "Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration." Ann N Y Acad Sci **962**: 318-31.
- Lomax, A. E., P. P. Bertrand and J. B. Furness** (2001). "Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon." Neuroscience **103**(1): 245-55.
- Lomax, A. E. and J. B. Furness** (2000). "Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon." Cell Tissue Res **302**(1): 59-72.
- Lomax, A. E., K. A. Sharkey, P. P. Bertrand, A. M. Low, J. C. Bornstein and J. B. Furness** (1999). "Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon." J Auton Nerv Syst **76**(1): 45-61.
- Lourenszen, S., K. G. Miller and M. G. Blennerhassett** (2009). "Discrete responses of myenteric neurons to structural and functional damage by neurotoxins in vitro." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **297**(1): G228-39.
- Lu, S. C.** (2009). "Regulation of glutathione synthesis." Mol Aspects Med **30**(1-2): 42-59.
- Ma, D., D. Wolvers, A. M. Stanisz and J. Bienenstock** (2003). "Interleukin-10 and nerve growth factor have reciprocal upregulatory effects on intestinal epithelial cells." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(5): R1323-9.
- Maher, P.** (2005). "The effects of stress and aging on glutathione metabolism." Ageing Res Rev **4**(2): 288-314.

- Maka, M., C. C. Stolt and M. Wegner** (2005). "Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect." Dev Biol **277**(1): 155-69.
- Mamelak, M.** (2007). "Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate." Neurobiol Aging **28**(9): 1340-60.
- Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, M. S. Chen, O. Bermingham-McDonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, K. Kobayashi and et al.** (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system." Nature **362**(6418): 312-8.
- Marcum, J. L., J. K. Mathenia, R. Chan and R. P. Guttman** (2005). "Oxidation of thiol-proteases in the hippocampus of Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **334**(2): 342-8.
- Markesbery, W. R.** (1999). "The role of oxidative stress in Alzheimer disease." Arch Neurol **56**(12): 1449-52.
- Marnett, L. J.** (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." Mutat Res **424**(1-2): 83-95.
- Maudlej, N. and M. Hanani** (1992). "Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig." Brain Res **578**(1-2): 94-8.
- McConalogue, K. and J. B. Furness** (1994). "Gastrointestinal neurotransmitters." Baillieres Clin Endocrinol Metab **8**(1): 51-76.
- McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto, S. A. Chanas, C. J. Henderson, L. I. McLellan, C. R. Wolf, C. Cavin and J. D. Hayes** (2001). "The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes." Cancer Res **61**(8): 3299-307.
- McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto and J. D. Hayes** (2003). "Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression." J Biol Chem **278**(24): 21592-600.
- Mearin, F., M. Mourelle, F. Guarner, A. Salas, V. Riveros-Moreno, S. Moncada and J. R. Malagelada** (1993). "Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction." Eur J Clin Invest **23**(11): 724-8.
- Meissner, G.** (1857). "Über die Nerven der Darmwand. ." Z. Ration. Med. N. F(8): 364-366.
- Melov, S., P. A. Adlard, K. Morten, F. Johnson, T. R. Golden, D. Hinerfeld, B. Schilling, C. Mavros, C. L. Masters, I. Volitakis, Q. X. Li, K. Loughton, A. Hubbard, R. A. Cherny, B. Gibson and A. I. Bush** (2007). "Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau." PLoS One **2**(6): e536.
- Minich, T., J. Riemer, J. B. Schulz, P. Wielinga, J. Wijnholds and R. Dringen** (2006). "The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes." J Neurochem **97**(2): 373-84.
- Mizuta, I., M. Ohta, K. Ohta, M. Nishimura, E. Mizuta and S. Kuno** (2001). "Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes." Neurosci Lett **310**(2-3): 117-20.
- Modlin, I. M., M. Kidd and J. Farhadi** (2000). "Bayliss and Starling and the nascence of endocrinology." Regul Pept **93**(1-3): 109-23.
- Moi, P., K. Chan, I. Asunis, A. Cao and Y. W. Kan** (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9926-30.

- Monneret, G., C. Cossette, S. Gravel, J. Rokach and W. S. Powell** (2003). "15R-methyl-prostaglandin D2 is a potent and selective CRTH2/DP2 receptor agonist in human eosinophils." J Pharmacol Exp Ther **304**(1): 349-55.
- Monneret, G., H. Li, J. Vasilescu, J. Rokach and W. S. Powell** (2002). "15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandins D2 and J2 are potent activators of human eosinophils." J Immunol **168**(7): 3563-9.
- Moore, M. W., R. D. Klein, I. Farinas, H. Sauer, M. Armanini, H. Phillips, L. F. Reichardt, A. M. Ryan, K. Carver-Moore and A. Rosenthal** (1996). "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 76-9.
- Morel, Y. and R. Barouki** (1999). "Repression of gene expression by oxidative stress." Biochem J **342 Pt 3**: 481-96.
- Moriez, R., H. Abdo, T. Chaumette, M. Faure, B. Lardeux and M. Neunlist** (2009). "Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: role of epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **382**(3): 577-82.
- Motohashi, H., T. O'Connor, F. Katsuoaka, J. D. Engel and M. Yamamoto** (2002). "Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors." Gene **294**(1-2): 1-12.
- Munoz, U., N. de Las Cuevas, F. Bartolome, O. G. Hermida, F. Bermejo and A. Martin-Requero** (2005). "The cyclopentenone 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients." Exp Neurol **195**(2): 508-17.
- Murphy, T. H., M. Miyamoto, A. Sastre, R. L. Schnaar and J. T. Coyle** (1989). "Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress." Neuron **2**(6): 1547-58.
- Nagahama, M., R. Semba, M. Tsuzuki and E. Aoki** (2001). "L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum." Biol Signals Recept **10**(5): 336-40.
- Nagata, S.** (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." Exp Cell Res **256**(1): 12-8.
- Nagy, J. I., W. Li, E. L. Hertzberg and C. A. Marotta** (1996). "Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease." Brain Res **717**(1-2): 173-8.
- Nagy, N. and A. M. Goldstein** (2006). "Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system." Dev Biol **293**(1): 203-17.
- Narumiya, S. and M. Fukushima** (1986). "Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition." J Pharmacol Exp Ther **239**(2): 500-5.
- Nasser, Y., E. Fernandez, C. M. Keenan, W. Ho, L. D. Oland, L. A. Tibbles, M. Schemann, W. K. MacNaughton, A. Ruhl and K. A. Sharkey** (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**(5): G912-27.
- Natarajan, D., C. Marcos-Gutierrez, V. Pachnis and E. de Graaff** (2002). "Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis." Development **129**(22): 5151-60.
- Neunlist, M., P. Aubert, S. Bonnaud, L. Van Landeghem, E. Coron, T. Wedel, P. Naveilhan, A. Ruhl, B. Lardeux, T. Savidge, F. Paris and J. P. Galmiche** (2007). "Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(1): G231-41.

- Neunlist, M., F. Toumi, T. Oreschkova, M. Denis, J. Leborgne, C. L. Laboisse, J. P. Galmiche and A. Jarry** (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**(5): G1028-36.
- Neunlist, M., L. Van Landeghem, A. Bourreille and T. Savidge** (2008). "Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease." J Intern Med **263**(6): 577-83.
- Newgreen, D. and H. M. Young** (2002). "Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1." Pediatr Dev Pathol **5**(3): 224-47.
- Newman, E. A.** (2003). "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP." J Neurosci **23**(5): 1659-66.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt, H. C. Huang, C. S. Yang and C. B. Pickett** (2003). "Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome." J Biol Chem **278**(7): 4536-41.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett** (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 233-60.
- Nigam, S. and T. Schewe** (2000). "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 167-81.
- Nishi, S. and R. A. North** (1973). "Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum." J Physiol **231**(3): 471-91.
- Norenberg, M. D. and A. Martinez-Hernandez** (1979). "Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain." Brain Res **161**(2): 303-10.
- Novelli, A., J. A. Reilly, P. G. Lysko and R. C. Henneberry** (1988). "Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced." Brain Res **451**(1-2): 205-12.
- Numazawa, S., M. Ishikawa, A. Yoshida, S. Tanaka and T. Yoshida** (2003). "Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress." Am J Physiol Cell Physiol **285**(2): C334-42.
- Olsson, C. and S. Holmgren** (2001). "The control of gut motility." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **128**(3): 481-503.
- Panatier, A.** (2009). "Glial cells: indispensable partners of hypothalamic magnocellular neurones." J Neuroendocrinol **21**(7): 665-72.
- Pavlick, K. P., F. S. Laroux, J. Fuseler, R. E. Wolf, L. Gray, J. Hoffman and M. B. Grisham** (2002). "Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease." Free Radic Biol Med **33**(3): 311-22.
- Petit, E., L. Oliver and F. M. Vallette** (2009). "The mitochondrial outer membrane protein import machinery: a new player in apoptosis?" Front Biosci **14**: 3563-70.
- Pfrieger, F. W. and B. A. Barres** (1997). "Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro." Science **277**(5332): 1684-7.
- Pichel, J. G., L. Shen, H. Z. Sheng, A. C. Granholm, J. Drago, A. Grinberg, E. J. Lee, S. P. Huang, M. Saarma, B. J. Hoffer, H. Sariola and H. Westphal** (1996). "Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 73-6.
- Pompolo, S. and J. B. Furness** (1988). "Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine." J Neurocytol **17**(6): 771-82.
- Pompolo, S. and J. B. Furness** (1993). "Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine." J Neurocytol **22**(7): 531-46.

- Pompolo, S. and J. B. Furness** (1998). "Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine." Cell Tissue Res **294**(2): 219-26.
- Poot, M., H. Teubert, P. S. Rabinovitch and T. J. Kavanagh** (1995). "De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle." J Cell Physiol **163**(3): 555-60.
- Portbury, A. L., S. Pompolo, J. B. Furness, M. J. Stebbing, W. A. Kunze, J. C. Bornstein and S. Hughes** (1995). "Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections." J Anat **187 (Pt 2)**: 303-21.
- Potoka, D. A., E. P. Nadler, J. S. Upperman and H. R. Ford** (2002). "Role of nitric oxide and peroxyxynitrite in gut barrier failure." World J Surg **26**(7): 806-11.
- Pouokam, E., M. Rehn and M. Diener** (2009). "Effects of H₂O₂ at rat myenteric neurones in culture." Eur J Pharmacol **615**(1-3): 40-9.
- Proskuryakov, S. Y., A. G. Konoplyannikov and V. L. Gabai** (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" Exp Cell Res **283**(1): 1-16.
- Purves, D., R. D. Hadley and J. T. Voyvodic** (1986). "Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to three months in the superior cervical ganglion of living mice." J Neurosci **6**(4): 1051-60.
- Purves, D. and J. W. Lichtman** (1985). "Geometrical differences among homologous neurons in mammals." Science **228**(4697): 298-302.
- Qin, J., R. Goswami, R. Balabanov and G. Dawson** (2007). "Oxidized phosphatidylcholine is a marker for neuroinflammation in multiple sclerosis brain." J Neurosci Res **85**(5): 977-84.
- Rao, A. V. and B. Balachandran** (2002). "Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases." Nutr Neurosci **5**(5): 291-309.
- Rauhala, P., A. M. Lin and C. C. Chiueh** (1998). "Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress." Faseb J **12**(2): 165-73.
- Reeves, M. A. and P. R. Hoffmann** (2009). "The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation." Cell Mol Life Sci **66**(15): 2457-78.
- Reiche, D., H. Pfannkuche, K. Michel and M. Schemann** (1998). "Structural and functional organization of the enteric nervous system in the stomach." Dtsch Tierarztl Wochenschr **105**(12): 461-5.
- Reier, P. J. and J. D. Houle** (1988). "The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair." Adv Neurol **47**: 87-138.
- Reinhart, P. H., B. Pfeiffer, S. Spengler and B. Hamprecht** (1990). "Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat glial primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme." J Neurochem **54**(5): 1474-83.
- Roessner, A., D. Kuester, P. Malfertheiner and R. Schneider-Stock** (2008). "Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis." Pathol Res Pract **204**(7): 511-24.
- Rosen, D. R.** (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **364**(6435): 362.
- Ruhl, A.** (2005). "Glial cells in the gut." Neurogastroenterol Motil **17**(6): 777-90.
- Ruhl, A., S. Franzke, S. M. Collins and W. Stremmel** (2001). "Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(6): G1163-71.
- Ruhl, A., S. Hoppe, I. Frey, H. Daniel and M. Schemann** (2005). "Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system." J Comp Neurol **490**(1): 1-11.

- Sagara, J. and N. Makino** (2008). "Glutathione induces neuronal differentiation in rat bone marrow stromal cells." *Neurochem Res* **33**(1): 16-21.
- Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam** (1999). "Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease." *Am J Med* **107**(5): 489-506.
- Sanders, K. M., T. Ordog, S. D. Koh, S. Torihashi and S. M. Ward** (1999). "Development and plasticity of interstitial cells of Cajal." *Neurogastroenterol Motil* **11**(5): 311-38.
- Sarosi, G. A., Jr., B. C. Kimball, D. C. Barnhart, W. Zhang and M. W. Mulholland** (1998). "Tachykinin neuropeptide-evoked intracellular calcium transients in cultured guinea pig myenteric neurons." *Peptides* **19**(1): 75-84.
- Savidge, T. C., P. Newman, C. Pothoulakis, A. Ruhl, M. Neunlist, A. Bourreille, R. Hurst and M. V. Sofroniew** (2007). "Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione." *Gastroenterology* **132**(4): 1344-58.
- Savidge, T. C., M. V. Sofroniew and M. Neunlist** (2007). "Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain." *Lab Invest* **87**(8): 731-6.
- Scabadasch, A.** (1930). "Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs." *Z. Zellforsch.*(10): 320-385.
- Schemann, M., C. Schaaf and M. Mader** (1995). "Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach." *J Comp Neurol* **353**(2): 161-78.
- Scher, J. U. and M. H. Pillinger** (2005). "15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin?" *Clin Immunol* **114**(2): 100-9.
- Schulz, J. B., J. Lindenau, J. Seyfried and J. Dichgans** (2000). "Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration." *Eur J Biochem* **267**(16): 4904-11.
- Sechi, L. A., A. Ruehl, N. Ahmed, D. Usai, D. Paccagnini, G. E. Felis and S. Zanetti** (2007). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infects and multiplies in enteric glial cells." *World J Gastroenterol* **13**(43): 5731-5.
- Selgrad, M., R. De Giorgio, L. Fini, R. F. Cogliandro, S. Williams, V. Stanghellini, G. Barbara, M. Tonini, R. Corinaldesi, R. M. Genta, R. Domiati-Saad, R. Meyer, A. Goel, C. R. Boland and L. Ricciardiello** (2009). "JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction." *Gut* **58**(1): 25-32.
- Shank, R. P., G. S. Bennett, S. O. Freytag and G. L. Campbell** (1985). "Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools." *Brain Res* **329**(1-2): 364-7.
- Sharkey, K. A., E. J. Parr and C. M. Keenan** (1999). "Immediate-early gene expression in the inferior mesenteric ganglion and colonic myenteric plexus of the guinea pig." *J Neurosci* **19**(7): 2755-64.
- Shih, A. Y., D. A. Johnson, G. Wong, A. D. Kraft, L. Jiang, H. Erb, J. A. Johnson and T. H. Murphy** (2003). "Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress." *J Neurosci* **23**(8): 3394-406.
- Sidebotham, E. L., M. N. Woodward, S. E. Kenny, D. A. Lloyd, C. R. Vaillant and D. H. Edgar** (2002). "Localization and endothelin-3 dependence of stem cells of the enteric nervous system in the embryonic colon." *J Pediatr Surg* **37**(2): 145-50.
- Sies, H.** (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82**(2): 291-5.
- Sies, H. and W. Stahl** (1995). "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants." *Am J Clin Nutr* **62**(6 Suppl): 1315S-1321S.
- Simmonds, N. J. and D. S. Rampton** (1993). "Inflammatory bowel disease--a radical view." *Gut* **34**(7): 865-8.
- Simonian, N. A. and J. T. Coyle** (1996). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 83-106.

- Singh, R. J., N. Hogg, J. Joseph and B. Kalyanaraman** (1996). "Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols." *J Biol Chem* **271**(31): 18596-603.
- Snyder, A. M. and J. R. Connor** (2009). "Iron, the substantia nigra and related neurological disorders." *Biochim Biophys Acta* **1790**(7): 606-14.
- Squier, T. C.** (2001). "Oxidative stress and protein aggregation during biological aging." *Exp Gerontol* **36**(9): 1539-50.
- Stach, W.** (1982). "[Neuronal organization of the myenteric plexus (Auerbach) in the swine small intestine. III. Type III neurons]." *Z Mikrosk Anat Forsch* **96**(3): 497-516.
- Stevnsner, T., T. Thorslund, N. C. de Souza-Pinto and V. A. Bohr** (2002). "Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging." *Exp Gerontol* **37**(10-11): 1189-96.
- Stohr, P., Jr.** (1952). "[Synopsis of research results on the microscopic innervation of the gastrointestinal tract.]." *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* **34**: 250-401.
- Stokes, A. H., T. G. Hastings and K. E. Vrana** (1999). "Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine." *J Neurosci Res* **55**(6): 659-65.
- Stoyanovsky, D. A., R. Goldman, R. M. Darrow, D. T. Organisciak and V. E. Kagan** (1995). "Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid." *Curr Eye Res* **14**(3): 181-9.
- Straus, D. S. and C. K. Glass** (2001). "Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets." *Med Res Rev* **21**(3): 185-210.
- Sugi, K., M. W. Musch, A. Di, D. J. Nelson and E. B. Chang** (2001). "Oxidants potentiate Ca(2+)- and cAMP-stimulated Cl(-) secretion in intestinal epithelial T84 cells." *Gastroenterology* **120**(1): 89-98.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger and G. Kroemer** (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* **397**(6718): 441-6.
- Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens and G. Kroemer** (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." *J Exp Med* **184**(4): 1331-41.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, S. W. Miller, J. B. Tuttle, P. A. Trimmer, J. P. Sheehan, J. P. Bennett, Jr., R. E. Davis and W. D. Parker, Jr.** (1996). "Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **40**(4): 663-71.
- Tabner, B. J., O. M. El-Agnaf, S. Turnbull, M. J. German, K. E. Paleologou, Y. Hayashi, L. J. Cooper, N. J. Fullwood and D. Allsop** (2005). "Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia." *J Biol Chem* **280**(43): 35789-92.
- Thompson, J. S., B. L. Nguyen and R. F. Harty** (1993). "Somatostatin analogue inhibits intestinal regeneration." *Arch Surg* **128**(4): 385-9.
- Thrasivoulou, C., V. Soubeyre, H. Ridha, D. Giuliani, C. Giaroni, G. J. Michael, M. J. Saffrey and T. Cowen** (2006). "Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons." *Aging Cell* **5**(3): 247-57.
- Timmermans, J. P., D. Adriaensen, W. Cornelissen and D. W. Scheuermann** (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**(2): 331-40.
- Timmermans, J. P., D. W. Scheuermann, W. Stach, D. Adriaensen and M. H. De Groot-Lasseel** (1992). "Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals." *Eur J Morphol* **30**(2): 113-22.

- Tornblom, H., G. Lindberg, B. Nyberg and B. Veress** (2002). "Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome." Gastroenterology **123**(6): 1972-9.
- Toumi, F., M. Neunlist, E. Cassagnau, S. Parois, C. L. Laboisse, J. P. Galmiche and A. Jarry** (2003). "Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model." Neurogastroenterol Motil **15**(3): 239-42.
- Tweeddale, H. J., M. Kondo and J. M. Gebicki** (2007). "Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals." Arch Biochem Biophys **459**(2): 151-8.
- Ueno, N., M. Murakami, T. Tanioka, K. Fujimori, T. Tanabe, Y. Urade and I. Kudo** (2001). "Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2." J Biol Chem **276**(37): 34918-27.
- Urade, Y. and O. Hayaishi** (2000). "Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 259-71.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser** (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Vallette, F.** (2001). "[Generalities on the molecular mechanisms of apoptosis]." Rev Neurol (Paris) **157**(4): 453-9.
- van der Vliet, A. and A. Bast** (1992). "Role of reactive oxygen species in intestinal diseases." Free Radic Biol Med **12**(6): 499-513.
- Van Landeghem, L., M. Mahé, J. Léger, I. Guisle, R. Teusan, H. Houlgate and M. Neunlist** (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial cell barrier functions. Gastroenterology.
- Vanderwinden, J. M.** (1999). "Role of Interstitial Cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system." Eur J Morphol **37**(4-5): 250-6.
- Vanderwinden, J. M., J. P. Timmermans and S. N. Schiffmann** (2003). "Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature." Cell Tissue Res **312**(2): 149-54.
- Vargas, M. R., M. Pehar, P. Cassina, L. Martinez-Palma, J. A. Thompson, J. S. Beckman and L. Barbeito** (2005). "Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: consequences for motor neuron survival." J Biol Chem **280**(27): 25571-9.
- Varilek, G. W., G. A. Neil, W. P. Bishop, J. Lin and N. J. Pantazis** (1995). "Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells." Am J Physiol **269**(3 Pt 1): G445-52.
- Ventura, R. and K. M. Harris** (1999). "Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes." J Neurosci **19**(16): 6897-906.
- Venugopal, R. and A. K. Jaiswal** (1996). "Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14960-5.
- Verkhatsky, A., R. K. Orkand and H. Kettenmann** (1998). "Glial calcium: homeostasis and signaling function." Physiol Rev **78**(1): 99-141.
- Vernet, P., N. Rigaudiere, N. Ghyselinck, J. P. Dufaure and J. R. Drevet** (1996). "In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage." Biochem Cell Biol **74**(1): 125-31.
- Verspaget, H. W., A. S. Pena, I. T. Weterman and C. B. Lamers** (1988). "Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content." Gut **29**(2): 223-8.

- Vogalis, F. and J. R. Harvey** (2003). "Altered excitability of intestinal neurons in primary culture caused by acute oxidative stress." *J Neurophysiol* **89**(6): 3039-50.
- Volterra, A. and J. Meldolesi** (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." *Nat Rev Neurosci* **6**(8): 626-40.
- von Boyen, G. B., M. Steinkamp, M. Reinshagen, K. H. Schafer, G. Adler and J. Kirsch** (2006). "Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines." *J Neuroendocrinol* **18**(11): 820-5.
- von Euler, U. S.** (1936). "On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin)." *J Physiol* **88**(2): 213-34.
- Wada-Takahashi, S. and K. Tamura** (2000). "Actions of reactive oxygen species on AH/type 2 myenteric neurons in guinea pig distal colon." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**(5): G893-902.
- Wada, K., A. Nakajima and R. S. Blumberg** (2001). "PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease." *Trends Mol Med* **7**(8): 329-31.
- Wakabayashi, K., H. Takahashi, E. Ohama and F. Ikuta** (1990). "Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system." *Acta Neuropathol* **79**(6): 581-3.
- Wallace, A. S. and A. J. Burns** (2005). "Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract." *Cell Tissue Res* **319**(3): 367-82.
- Wang, X., N. Lou, Q. Xu, G. F. Tian, W. G. Peng, X. Han, J. Kang, T. Takano and M. Nedergaard** (2006). "Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo." *Nat Neurosci* **9**(6): 816-23.
- Wang, X. and P. J. Quinn** (1999). "Vitamin E and its function in membranes." *Prog Lipid Res* **38**(4): 309-36.
- Wedel, T., H. J. Krammer, W. Kuhnel and W. Sigge** (1998). "Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry." *Pediatr Pathol Lab Med* **18**(1): 57-70.
- Wijesekera, L. C. and P. N. Leigh** (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Orphanet J Rare Dis* **4**: 3.
- Winterbourn, C. C. and D. Metodiewa** (1994). "The reaction of superoxide with reduced glutathione." *Arch Biochem Biophys* **314**(2): 284-90.
- Wolf, M., F. Schrodli, W. Neuhuber and A. Brehmer** (2007). "Calcitonin gene-related peptide: a marker for putative primary afferent neurons in the pig small intestinal myenteric plexus?" *Anat Rec (Hoboken)* **290**(10): 1273-9.
- Wolff, S. P., Z. A. Bascal and J. V. Hunt** (1989). ""Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory." *Prog Clin Biol Res* **304**: 259-75.
- Wood, J. D., D. H. Alpers and P. L. Andrews** (1999). "Fundamentals of neurogastroenterology." *Gut* **45 Suppl 2**: II6-II16.
- Wood, J. D. and C. J. Mayer** (1978). "Intracellular study of electrical activity of Auerbach's plexus in guinea-pig small intestine." *Pflugers Arch* **374**(3): 265-75.
- Wood, J. D. and C. J. Mayer** (1978). "Slow synaptic excitation mediated by serotonin in Auerbach's plexus." *Nature* **276**(5690): 836-7.
- Wu, J. J., J. X. Chen, T. P. Rothman and M. D. Gershon** (1999). "Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors." *Development* **126**(6): 1161-73.
- Yamamoto, Y. and K. Takahashi** (1993). "Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides." *Arch Biochem Biophys* **305**(2): 541-5.

- Yamashita, H. and M. Matsumoto** (2007). "Molecular pathogenesis, experimental models and new therapeutic strategies for Parkinson's disease." *Regen Med* **2**(4): 447-55.
- Yang, X., K. E. Hill, M. J. Maguire and R. F. Burk** (2000). "Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes." *Biochim Biophys Acta* **1474**(3): 390-6.
- Yntema, C. L. and W. S. Hammond** (1954). "The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo." *J Comp Neurol* **101**(2): 515-41.
- Yoh, K., K. Itoh, A. Enomoto, A. Hirayama, N. Yamaguchi, M. Kobayashi, N. Morito, A. Koyama, M. Yamamoto and S. Takahashi** (2001). "Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis." *Kidney Int* **60**(4): 1343-53.
- Young, H. M., A. J. Bergner and T. Muller** (2003). "Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine." *J Comp Neurol* **456**(1): 1-11.
- Young, H. M., C. J. Hearn, D. Ciampoli, B. R. Southwell, J. F. Brunet and D. F. Newgreen** (1998). "A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture." *Dev Biol* **202**(1): 67-84.
- Young, H. M., C. J. Hearn, P. G. Farlie, A. J. Canty, P. Q. Thomas and D. F. Newgreen** (2001). "GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells." *Dev Biol* **229**(2): 503-16.
- Yuan, J., A. Takahashi, N. Masumori, K. Uchida, S. Hisasue, H. Kitamura, N. Itoh and T. Tsukamoto** (2005). "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma have potent antitumor effect against human renal cell carcinoma." *Urology* **65**(3): 594-9.
- Zhang, D. D., S. C. Lo, J. V. Cross, D. J. Templeton and M. Hannink** (2004). "Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex." *Mol Cell Biol* **24**(24): 10941-53.
- Zhang, W., B. J. Segura, T. R. Lin, Y. Hu and M. W. Mulholland** (2003). "Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig." *Glia* **42**(3): 252-62.
- Zhang, X., L. Lu, C. Dixon, W. Wilmer, H. Song, X. Chen and B. H. Rovin** (2004). "Stress protein activation by the cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human mesangial cells." *Kidney Int* **65**(3): 798-810.
- Zhou, W. and C. R. Freed** (2005). "DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity." *J Biol Chem* **280**(52): 43150-8.

CONTROLE DE LA SURVIE NEURONALE PAR LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES DANS DES CONDITIONS DE STRESS OXYDANT

RESUME: Des phénomènes de neurodégénérescence du système nerveux entérique (SNE) ont été décrits au cours d'états inflammatoires intestinaux et chez des malades atteints de pathologies neurodégénératives centrales. Par ailleurs, des études récentes ont montré l'importance des cellules gliales entériques (CGE) dans le contrôle des fonctions neuronales. Néanmoins, le rôle neuroprotecteur potentiel de ces cellules reste très mal connu. Aussi, le but de ce travail de thèse était de mettre en évidence le contrôle de la survie neuronale par les CGE et d'identifier les mécanismes et les médiateurs impliqués. En utilisant une stratégie d'infection adénovirale, nous avons d'abord montré que la destruction spécifique des CGE présentes dans les cultures primaires induisait une dégénérescence des neurones entériques en conditions basales mais aussi lors d'un stress oxydant induit par la dopamine ou le peroxyde d'hydrogène. La co-culture de lignées de CGE avec les cultures primaires de SNE ou avec une lignée de neuroblastome humain permet une réduction de la mort apoptotique des neurones induite par le stress oxydant. L'ajout de milieu conditionné de CGE reproduit cet effet neuroprotecteur démontrant ainsi l'implication de facteur(s) soluble(s) dans la neuroprotection. Parmi les médiateurs impliqués, nous avons identifié le glutathion réduit (GSH), qui aurait une action directe sur le microenvironnement neuronal. L'implication du GSH a été démontrée en inhibant sa synthèse à la fois par des approches génétiques (ARN interférence) et pharmacologiques. Par ailleurs, Nous avons mis en évidence l'implication d'un autre médiateur, la 15d-PGJ₂, dérivée des oméga-6, qui permet une protection préventive et à long terme. L'implication de la 15d-PGJ₂ a été démontrée en bloquant la synthèse de cette molécule au sein les CGE par ARN interférence. Enfin, nous avons mis en évidence une neuroprotection par les cellules épithéliales intestinales qui sont présentent à proximité des neurones. En conclusion, nos travaux démontrent que les CGE possèdent des capacités neuroprotectrices dans le SNE lors d'un stress oxydant induit. La capacité neuroprotectrice des CGE, similaire à celle décrite pour les astrocytes du système nerveux central, pourrait être utilisée comme une cible thérapeutique au cours des neuropathies entériques.

Mots-clés : *système nerveux entérique, cellules gliales entériques, stress oxydant, dopamine, peroxyde d'hydrogène, neurodégénérescence, neuroprotection, Caspase3, glutathion réduit, 15d-PGJ₂*

CONTROL OF NEURONAL SURVIVAL BY ENTERIC GLIAL CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

Abstract: Neurodegeneration of the enteric nervous system (ENS) has been reported during various intestinal inflammatory conditions and neurodegenerative disorders of the central nervous system. Increasing evidence suggests that the enteric glial cells (EGC) are critical for enteric neurons functions. It has been suggested that, like astrocytes in central nervous system, EGC may have neuroprotective properties. Nevertheless, this putative neuroprotective role of EGC has never been demonstrated. The aim of this study was to demonstrate the control of neuronal survival by EGC under oxidative stress conditions. Using specific adenoviral transduction, we first demonstrated that specific ablation of EGC in primary cultures of ENS promotes basal neuronal cell death and amplify neuronal death induced by dopamine or hydrogen peroxide. In co-culture experiments, EGC had neuroprotective effects both on ENS primary cultures and human neuroblastoma cells. These effects were also obtained by EGC conditioned medium suggesting that one or more soluble factors are involved. Among these factors, we identified reduced glutathione (GSH) responsible of direct and rapid neuroprotection by EGC. GSH involvement has been shown by inhibiting its synthesis using genetic (RNA interference) and pharmacological approaches. We also identified a second mediator, the ω 6-derivative 15d-PGJ₂, involved in the preventive and long term neuroprotection by EGC. The direct implication of 15d-PGJ₂ pathway of EGC has been shown by using specific gene silencing. Finally we demonstrated that intestinal epithelial cells, cells in the proximity of enteric neurons, can also protect neurons against oxidative stress. In conclusion, our data demonstrate that EGC play a crucial role in the control of neuronal survival against oxidative stress. Therefore increasing EGC neuroprotective capacities could be of therapeutic interest in enteric neuropathies.

Key words: *Enteric nervous system, enteric glial cells, oxidative stress, dopamine, hydrogen peroxide, neurodegeneration, neuroprotection, Caspase 3, Reduced glutathione, 15d-PGJ₂*

Hind ABDO INSERM U913, IMAD, CHU Hotel Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes